

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Efecto antioxidante y antitumoral in vitro del extracto
etanólico de la raíz de Waltheria ovata Cav. "lucraco" en
línea celular de cáncer de próstata DU-145**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magister en Farmacología con Mención
en Farmacología Experimental

AUTOR

Oscar Herrera Calderón

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR

AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN FARMACOLOGÍA CON MENCIÓN EN FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL



Siendo las 09:00 horas del 30 de mayo 2014 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador, presidido por la Dra. María Elizabeth Gonzáles Loayza e integrado por los siguientes miembros: Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo, Dr. Yovani Martín Condo huamán Figueroa, Dr. Víctor Chumpitaz Cerrate y la Mg. María Elena Salazar Salvatierra; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"EFECTO ANTIOXIDANTE Y ANTITUMORAL IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAÍZ DE *Waltheria ovata* Cav. "lucraco" EN LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PRÓSTATA DU-145**, del Bachiller en Farmacia y Bioquímica **OSCAR HERRERA CALDERON**, de la Maestría en Farmacología con Mención en Farmacología Experimental.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de Magíster en Farmacología con Mención en Farmacología Experimental. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

excelente (19) diecinueve

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica, **OSCAR HERRERA CALDERON**, el Grado Académico de Magíster en Farmacología con Mención en Farmacología Experimental.

Siendo las *11:30* h. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las *11:40* h. del 30 de mayo 2014.

M. Elizabeth Gonzáles Loayza

Dra. María Elizabeth Gonzáles Loayza (P.P., D.E.)
Presidenta

Jorge Luis Arroyo Acevedo

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (P.P., T.C.)
Miembro-Asesor

Yovani M. Condo huamán Figueroa

Dr. Yovani M. Condo huamán Figueroa (P.Aux., T.C.)
Miembro

Víctor Chumpitaz Cerrate

Dr. Víctor Chumpitaz Cerrate (P.Aux., T.P.)
Miembro

María Elena Salazar Salvatierra

Mg. María Elena Salazar Salvatierra (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:

.....

A mis padres

Oscar y Hemilda

Quienes con su amor, apoyo y comprensión incondicional estuvieron siempre presentes a largo de mi vida y por la tranquilidad que me brindan cada día para alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Jorge L. Arroyo Acevedo profesor principal de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Por su valiosa asesoría y dedicación en la elaboración del presente trabajo.

Al PhD Abraham J. Vaisberg Wolach científico, profesor e investigador de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.
Por su valiosa colaboración y dedicación.

Al Dr. Pablo E. Bonilla Rivera profesor principal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
Por su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Felipe A. Surco Laos profesor principal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.

A los miembros del Jurado Examinador y Calificador.

INDICE GENERAL

Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Lista de Tablas	vii
Lista de Figuras	viii
Resumen	x
Summary	xi
I. INTRODUCCIÓN	
1.1. Situación problemática	1
1.2. Formulación del problema	2
1.3. Justificación Teórica	2
1.4. Justificación práctica	5
1.5. Objetivos	7
1.5.1. Objetivo general	7
1.5.2. Objetivo específico	7
II. MARCO TEÓRICO	
2.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación	8
2.2. Antecedentes Internacionales	9
2.3. Antecedentes Nacionales	11
2.4. Bases teóricas	12
2.4.1. Sistema de defensa antioxidante	12
2.4.2. Sistema de defensa antioxidante endógeno	14
2.4.3. Sistema de defensa antioxidante exógeno	18
2.4.4. Determinación de capacidad antioxidante in vitro	26
2.4.5. Cáncer de Próstata y estrés oxidativo	33
2.4.6. Aspectos generales de la familia Sterculaceae	35
2.4.7. Células DU-145 (adenocarcinoma de próstata)	38
III. METODOLOGÍA	
3.1. Tipología de la investigación	40
3.2. Diseño de la investigación	40
3.3. Universo y muestra de trabajo	40
3.4. Método operativo	41
3.4.1. Determinación de los metabolitos secundarios	41
3.4.2. Cuantificación de polifenoles totales	42

3.4.3. Evaluación del efecto antioxidante in vitro	43
3.4.4. Bioensayo del efecto antitumoral in vitro	45
3.4.5. Evaluación de la seguridad del extracto Etanólico de <i>Waltheria ovata</i> Cav. "lucraco	47
3.4.6. Tratamiento estadístico	48
3.4.7. Consideraciones éticas	49
 IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Resultados	50
4.1.1. Ubicación taxonómica de <i>Waltheria ovata</i>	50
4.1.2. Análisis fitoquímico cualitativo preliminar	51
4.1.3. Cuantificación de los polifenoles totales	52
4.1.4. Efecto antitumoral sobre la línea DU-145	53
4.1.5. Evaluación de la seguridad a nivel preclínico del extracto etanólico de la raíz de <i>Waltheria ovata</i>	56
4.1.6. Evaluación de la seguridad a nivel preclínico del extracto etanólico de la raíz de <i>Waltheria ovata</i>	57
4.2. Discusión	59
 CONCLUSIONES.	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	73

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número y concentración de células por pozo.

Tabla 2. Diluciones del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. y 5-fluorouracilo.

Tabla 3. Prueba preliminar cualitativa de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. “lucraco”.

Tabla 4. Cuantificación de polifenoles totales del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Tabla 5. Determinación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical 1,1 difenil-picri-hidrazil (DPPH) del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Tabla 6. Determinación de la actividad antioxidante mediante Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Tabla 7. Determinación de la actividad antioxidante mediante Ensayo de Capacidad Antioxidante Total (TEAC) del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Tabla 8. Valores de GI 50 y citotoxicidad del extracto etanólico de *Waltheria ovata*. y 5- Fluoro-Uracilo en célula tumoral y normal.

Tabla 9. Parámetros bioquímicos hematológicos de las ratas sometidas a tratamiento con el E.E. de *Waltheria ovata* durante 28 días.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los antioxidantes

Figura 2. Representación de las principales rutas metabólicas y productoras de radicales libres.

Figura 3. Detoxificación de las especies reactivas de oxígeno por sistemas enzimáticos de defensa antioxidante.

Figura 4. Estructura básica de un flavonoide y sistema de numeración.

Figura 5. Subclase de flavonoides.

Figura 6. Biosíntesis parcial de flavonoides tipo flavona.

Figura 7. Características estructurales de flavonoides con actividad atrapadora de radicales libres.

Figura 8. Mecanismo de reacción en el método FRAP.

Figura 9. Formación del radical ABTS.

Figura 10. Mecanismo de estabilización del radical ABTS.

Figura 11. Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

Figura 12. Mecanismo de reacción del radical DPPH con el estándar Trolox

Figura 13. Formula estructural del Trolox

Figura 14. Estructura de la Waltherina A

Figura 15. Estructura de la Waltherina B

Figura 16. Estructura de la Waltherina C.

Figura 17. Estructura de la Waltheriona A

Figura 18. Estructura de la Waltheriona B

Figura 19. Estructura de la 2',3', 5'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona.

Figura 20. Estructura de la 5,2'-dihidroxi-3,7,4',5'tetrametoxiflavona.

Figura 21. Estructura de quercetina.

Figura 22. Estructura de la epicatequina.

Figura 23. Estructura de la tilirosida.

Figura 24. Curva de calibración del ácido gálico

Figura 25. Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto etanólico de raíz de Waltheria ovata Cav.

Figura 26. Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical FRAP del extracto etanólico de raíz de Waltheria ovata Cav

Figura 27. Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto etanólico de raíz de Waltheria ovata Cav

Figura 28. Comparación del efecto antitumoral de las sustancias citotóxicas sobre la línea celular tumoral DU-145 (adenocarcinoma de próstata)

Figura 29. Comparación del efecto antitumoral de las sustancias citotóxicas sobre la línea celular fibroblastos normales de ratón 3T3

Figura 30. Evaluación del peso de los ratones en el estudio de la toxicidad oral aguda durante 14 días

RESUMEN

Objetivos: Evaluar el efecto antioxidante y antitumoral *in vitro* del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. sobre la línea celular DU-145.

Institución: Laboratorio de Investigación y Desarrollo, Universidad Nacional Peruana Cayetano Heredia y Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Material biológico: Línea celular tumoral humana DU-145, fibroblastos normales de ratón 3T3, ratas Holzman de ambos sexos, ratones albinos machos Balb/C53.

Intervenciones: Actividad antioxidante *in vitro* evaluándose mediante los ensayos de captación del radical DPPH, FRAP y ABTS, utilizando como controles positivos trolox y vitamina C. Las líneas celulares fueron expuestas a cuatro concentraciones del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. y 5-fluorouracilo (5-FU). La toxicidad aguda oral según la OECD se realizó en ratones albinos machos Balb C/53 de 40 días post destete, a cinco dosis de tratamiento evaluándose el número de muertes en cada dosis.

Principales medidas de los resultados: Concentración inhibitoria 50 (CI50) del extracto etanólico de *Waltheria ovata* sobre el radical DPPH, FRAP, ABTS. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular (GI50), dosis letal 50 (DL50).

Resultados: El extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* para el radical DPPH ($0,48 \pm 0,02$ ug/mL). FRAP ($0,41 \pm 0,08$ ug/mL), ABTS ($0,38 \pm 0,02$ ug/mL). GI50 mayor a 250 ug/mL para la línea DU-145 ($r = 0,99$; $p < 0,01$). DL50 $> 2\,000$ mg /kg.

Conclusiones: Se ha demostrado que el extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. Presenta efecto antioxidante superando al trolox y vitamina C, no presenta efecto antitumoral *in vitro* para la línea celular tumoral humana DU-145; y, es no tóxico en ratones.

Palabras claves: Antioxidante, antitumoral, *Waltheria ovata*, DPPH, FRAP, ABTS, DU-145.

SUMMARY

Objectives: To assess the antioxidant and antitumor effect in vitro of ethanolic extract of the root of *Waltheria ovata* Cav. on the cell line DU-145. Institution: Laboratory of research and development, National Cayetano Heredia University, Laboratory of Pharmacology, Faculty of Human Medicine, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru. **Biological material:** Cellular tumor human line DU-145, normal fibroblasts from mouse 3T3, rats of both sexes Holzman, mice albino male Balb/C53. Interventions: Antioxidant activity in vitro evaluated through trials of attracting radical DPPH, FRAP and ABTS, using positive controls trolox and vitamin C. The cell lines were exposed to four concentrations of ethanolic extract of the root of *Waltheria ovata* Cav. and 5-fluorouracil (5-FU). The oral acute toxicity was carried out in mice albino male Balb C/53 40 days post weaning, to five doses of treatment evaluated the number of deaths in each dose. **Main outcomes measures:** inhibitory concentration 50 (IC50) of the ethanolic extract of *Waltheria ovata* on radical DPPH, FRAP, ABTS. Percentage inhibition (GI50), 50 lethal dose (LD50) cell growth. Results: The ethanolic extract of the root of *Waltheria ovata* for radical DPPH (0.48 ± 0.02 ug/mL), FRAP (0.41 ± 0.08 ug/mL), ABTS (0.38 ± 0.02 ug/mL). GI50 greater than 250 ug/mL for line DU-145 ($r = 0.99$; $p < 0.01$). DL50 > 2.000 mg/kg. **Conclusions:** The ethanolic extract of the root of *Waltheria ovata* Cav. He presented good antioxidant activity by inhibiting the radical DPPH, FRAP and ABTS, surpassing the positive controls as the trolox and vitamin C, not evidenced Antitumor effect in vitro cell line DU-145 human tumor and according to the OECD classification ethanolic extract was classified as non-toxic.

Key words: Antioxidant, antitumoral, *Waltheria ovata*, DPPH, FRAP, TEAC, DU-145.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

A nivel mundial, el cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más diagnosticado en hombres (899 000 nuevos casos al año, 13,6% del total), aproximadamente el 75% de los casos se registran en países desarrollados y las tasas de incidencia más altas se observan en Australia/Nueva Zelanda; 104,2 por 100 000, Europa y Norteamérica, debido al uso del antígeno específico prostático (PSA), y a la subsecuente biopsia de próstata, utilizada ampliamente en dichas regiones. Las tasas de incidencia son relativamente altas en algunas regiones en desarrollo como el Caribe, América del Sur y África. La incidencia más baja se observa en Asia 4,1 por 100 000 (Ferlay *et al.*, 2010).

En el Perú, el cáncer de próstata presenta una incidencia que va en aumento, asociado al incremento de la esperanza de vida y la longevidad. A la fecha, el Registro de Cáncer de Lima Metropolitana ha publicado cuatro reportes sobre el cáncer en el Perú. Según este Registro, en el período en el periodo 1994-1997, el cáncer más frecuente en Lima Metropolitana fue el de próstata, seguido de estómago y pulmón, con una tasa de incidencia de 18,08; 16,55 y 11,24 por 100 000 habitantes, respectivamente, Para los años 2004-2005, el cáncer de próstata presentó una tasa de incidencia cruda (TIC) de 34,31 y una tasa de incidencia estandarizada por edad (TIEE) de 35,89. En Trujillo (1996-2002) la TIC es de 16,0 y una TIEE de 25,8. Finalmente, en Arequipa (2002-2007) presenta una TIC de 35,0 y una TIEE de 37,8. Una revisión de los casos diagnosticados de cáncer de próstata en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en Lima, Perú del último quinquenio, entre el 2006 y el 2010, el 21% fueron estadio I-II; 42% estadio III, y 37% avanzados tipo metastásicos (Pow-Sang & Huamán, 2013).

El proyecto GLOBOCAN proporciona estimados de la incidencia, mortalidad y prevalencia de los cánceres más frecuentes de 184 países a nivel mundial. El último reporte de GLOBOCAN es del año 2008. Este Proyecto reporta que para el Perú se estimó que en el 2008 ocurrieron 4142 casos nuevos de cáncer de próstata. Esa misma fuente reporta que el cáncer más frecuente es el de próstata, seguido de estómago y luego pulmón; con una tasa de incidencia estandarizada por edad de 37,1; 22,6 y 7,8 respectivamente. La tasa de incidencia cruda (TIC) del cáncer de próstata fue 28,7 casos por cada 100 000 hombres y la TEE de mortalidad de 14,0 (INEN, 2011; Ferlay *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2008).

El tratamiento del cáncer de próstata es considerado un problema de salud pública debido al costo elevado del manejo de los pacientes con enfermedad localmente avanzada o avanzada, y al alto impacto económico que genera en sus familias.

1.2. Formulación del problema.

¿Presenta el extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. “lucraco” efecto antioxidante y antitumoral *In vitro* sobre la línea celular de cáncer de próstata DU-145?

1.3. Justificación Teórica.

El estrés oxidativo ha sido implicado en el desarrollo de numerosas enfermedades crónicas y procesos de envejecimiento, generando especies reactivas de oxígeno (ERO), que tiene como potencial, el causar daño al ADN y ha sido asociado al desarrollo de cancer en humanos, incluyendo el cáncer de próstata (Kriston *et al.*, 2011; Khandrika, 2008; Klaunig, 2011). Uno de los mecanismos por el cual ERO podrían originar el cáncer es la inflamación crónica, implicado en la etiología de la mayoría de cáncer malignos incluyendo al de próstata (De Marzo *et al.*, 2007; Lonkar & Dedon, 2011).

El cáncer de próstata es el resultado de la proliferación de células anormales que se originan en la próstata, una pequeña glándula del sistema reproductor masculino. Los marcadores distintivos de esta enfermedad incluyen las siguientes: 1) inestabilidad genómica; 2) la capacidad de células anormales de resistir la muerte celular, evadiendo la supresión del crecimiento e induciendo señales proliferativas; 3) inflamación crónica que resulta en promoción del tumor; y 4) angiogénesis, invasión, y metástasis a órganos distantes (Hanahan & Weinberg, 2011). Estas características son a menudo manejadas al mayor nivel fundamental, por desregulación de la expresión del gen. Desde el punto de vista clásico en la etiología de la enfermedad, es que las alteraciones genéticas, son provocadas por la exposición a genotóxicos exógenos y agentes oxidantes endógenos dañando el ADN e induciendo mutaciones, resultando proteínas no funcionales que son la base de la progresión de esta enfermedad. Históricamente las anormalidades genéticas y mutaciones son citadas como factores de causa primaria, sin embargo los mecanismos epigenéticos son ahora reconocidos que juegan un rol en el desarrollo del cáncer (Boumber & Issa 2011).

La obesidad y hábitos inadecuados de alimentación promocionan el desarrollo del cáncer (Davies et al., 2009). Una dieta saludable baja en grasas saturadas, monoinsaturadas y alta en poliinsaturadas rico en omega-3, vitamina C, vitamina E, licopeno, alfa tocoferol, selenio, beta caroteno y quercetina están inversamente asociados con el riesgo de padecer cáncer de próstata (Craig, 2009). Los efectos benéficos de estos nutrientes en la prevención del cáncer de próstata (CaP) podrían estar relacionados a los niveles de antioxidantes. Entre los químicos presentes en los alimentos tenemos a la curcumina, Epigallocatequina-3-galato (EGCG) y genisteína que tiene actividad desmetiladora. Estudios epidemiológicos han indicado una relación entre una baja incidencia de cáncer de próstata y una dieta abundante en estos compuestos (Moiseeva et al., 2007).

Por otra parte en pacientes con cáncer de próstata, se han detectado alteraciones en la peroxidación lipídica con cambios concomitantes en el sistema de defensa antioxidante. Esto conduce a un balance pro oxidante y

antioxidante alterado que puede producir un aumento del daño oxidativo y consecuentemente jugar un rol importante en la carcinogénesis de la próstata (Aydin *et al.*, 2006).

El uso de plantas como medicina ha hecho posible el aislamiento y caracterización de principios activos con interés farmacológico y hoy en día hay al menos 120 sustancias químicas derivadas de plantas que son considerados como drogas importantes e ingredientes en la industria farmacéutica (Wang *et al.*, 2011). El descubrimiento de nuevos agentes anticancerígenos derivados de fuentes vegetales es una de los alcances realistas y prometedores en el campo de la quimio prevención del cáncer y esto ha permitido el descubrimiento de numerosas drogas con efecto anticancerígeno, incluye a los alcaloides de la vinca, vinblastina y vincristina, taxol, campotecinas, podofilotoxinas (Cragg & Newman, 2005).

Las interacciones de los receptores de factor de crecimiento autocrino y paracrino y señales mitogénicas asociadas con los defectos de señales apoptóticos, son los mayores contribuyentes en la proliferación e inmortalización de células de cáncer prostático. El crecimiento y su desarrollo de estas células ha llegado a ser independiente de andrógenos y resistentes a la terapia de ablación de andrógenos siendo este inefectiva, desarrollando resistencia. De acuerdo al avance de nuevas estrategias terapéuticas sobre la inducción de la apoptosis podría ser efectivo en el control de la proliferación y estados invasivos del CaP. En respecto a la evaluación de compuestos naturales (derivados de plantas) han generado su atención en los recientes años con la pronta espera de noticias positivas en la quimioprevención, quimioterapia de varios tipos de cáncer incluyendo el CaP (Agarwal, Singh & Agarwal, 2002)

Por otra parte el antígeno prostático específico (PSA) es una serina proteasa que es usada ampliamente para confirmar Inmuno histoquímicamente el origen de carcinoma metastásico de próstata. Pero el PSA no es específico de la próstata, este marcador también ha sido detectado en carcinomas de ovario y mama, incluyen el cancer mamario en varones y otros tejidos, pero es probable que la mayoría aun lo utilice como

marcador prostático. Sin embargo un alto grado de tumores y metástasis pueden ser PSA negativos, el cual limita mucho este valor (Kristiansen, 2012). Es por ello que en la presente investigación se experimenta con el cultivo de línea celular DU-145 (células de carcinoma de próstata humano independiente de andrógenos).

Los compuestos fenólicos son moléculas de importancia demostrada de actividad antioxidante, presentan un numeroso grupo ampliamente distribuido en la naturaleza y son componentes importantes en la dieta humana. El consumo promedio de fenoles en los países europeos se estima en 23 mg/día. Existe un interés creciente en los compuestos fenólicos debido a su efecto contra algunas enfermedades como ciertos cánceres y desordenes cardíacos derivados de su poderosa actividad antioxidante (Agarwal, Singh & Agarwal, 2002).

El género *Waltheria* está representado a nivel mundial por unas 60 especies, ampliamente distribuidas en los países tropicales. Caracterizados por tener una gran cantidad de compuestos fenólicos y alcaloides. *Waltheria ovata* es una especie del género con propiedades curativas, la cual es empleada en la medicina popular de Ica, (Perú), donde es conocida como lucraco, palo negro o negrilla. La infusión de las hojas y tallo de *W. ovata*, son usadas para tratar afecciones bronquiales y problemas de tos. En las últimas décadas, las raíces de la planta se han utilizado como antiinflamatorio prostático (Gressler et al., 2008).

1.4. Justificación Práctica.

El cáncer de próstata es una realidad en nuestro medio será más frecuente en el futuro mediato debido al incremento de personas adultas mayores. Se ha estimado que el costo promedio del tratamiento de los pacientes tratados en el INEN, con cáncer de próstata localizado sometidos a prostatectomía radical con fines curativos son elevados y estos costos aumentan considerablemente si el paciente tiene que recibir quimioterapia o tratamiento de dolor en una enfermedad avanzada, además los casos de

cáncer de próstata metastásico con PSA menores de 10 ng/mL tienden a ser de mal pronóstico debido a su agresividad y pobre respuesta a la ablación hormonal (Díaz & Salirrosas, 2012).

En esta investigación la importancia está basado en la comprobación del efecto antioxidante y antitumoral sobre la línea celular DU-145 (carcinoma de próstata humano) del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco".

Contribuir en ampliar el conocimiento de los usos atribuidos al lucraco. Ofertar un producto natural, que permita la protección sobre los radicales libres generados durante el estrés oxidativo por injuriantes químicos. Legar un producto quimiopreventivo de bajo costo y que permitiría una formulación farmacéutica para posteriores ensayos preclínicos *in vivo* y clínicos.

Durante los últimas décadas muchos estudios han indicado que el mecanismo de acción de estos agentes contra el cáncer está basada en la inducción de la apoptosis y abre una nueva estrategia en la investigación. Una inducción de la apoptosis es una característica deseable de la estrategia en la quimio prevención del cáncer. De ahí que es importante cribar inductores de la apoptosis procedentes de plantas ya sea como extracto o como principio activo aislado. Esta clase de estudios debería ser realizada primero para evaluar la citotoxicidad e inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer antes del uso de animales de experimentación y estudios clínicos.

1.5. Objetivos.

1.5.1. Objetivo general

Determinar el efecto antioxidante y antitumoral *in vitro* del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco" sobre la línea celular de cáncer de próstata DU-145.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar mediante el screening fitoquímico preliminar los metabolitos secundarios del extracto etanólico obtenido de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco".
2. Cuantificar los fenoles totales presentes en el extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco".
3. Determinar el efecto antioxidante *in vitro* mediante el ensayo de captación del radical 2,2-difenilpicril-1-hidracil (DPPH), reducción del hierro - poder antioxidante (FRAP) y por el método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS).
4. Determinar el efecto antitumoral *in vitro* del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco" sobre la línea celular DU-145 (adenocarcinoma de próstata) mediante el ensayo de coloración con Sulforodamina B (SRB).
5. Evaluar la seguridad del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco" en ratas a dosis repetidas por 28 días y en ratones a dosis única con observación de 14 días.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación.

❖ Radicales libres y su relación con el cáncer.

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de especies reactivas oxigenadas y nitrogenadas que pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario, o de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV, el ozono y ciertos medicamentos (De Souza, et al., 2004). Aunque la exposición a las especies reactivas oxigenadas procedentes de fuentes exógenas sea extremadamente elevada, la exposición a fuentes endógenas es mucho más importante y extensa, debido a que es un proceso que se da de forma continua en las células de nuestro organismo a lo largo de la vida (Loizzo, et al., 2008).

Cuando el organismo se ve desbordado por un exceso de especies radicalarias, prácticamente cualquier estructura biológica que lo integra (ADN, ARN, proteínas, carbohidratos y lípidos) puede convertirse en diana de la acción de estas especies reactivas y resultar dañada. El daño causado por el ataque de especies reactivas oxigenadas y nitrogenadas (SRO y SRN) puede originar lesiones en el ADN, pérdida de función de enzimas, incremento de la permeabilidad celular, disrupción de la señalización en la célula y, en ocasiones, muerte celular por necrosis o apoptosis. Por este motivo, es común relacionar el daño provocado por las diversas especies reactivas con la fisiopatología de varias enfermedades como el cáncer, la diabetes (Martínez, 2005) y enfermedades pulmonares como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la sarcoidosis (Green, 2007).

❖ **Modelos celulares para la investigación del cáncer.**

El daño producido por el ataque de radicales libre puede causar daños a nivel de ADN que se traduzcan en potenciales procesos tumorales y cancerígenos. Los compuestos antioxidantes pueden prevenir o limitar estos procesos por diferentes mecanismos de acción como la actividad antioxidante y secuestro de radicales libres, regulación de la expresión génica en la proliferación y diferenciación celular, inducción de arresto del ciclo celular y apoptosis, modulación de enzimas relacionadas con detoxificación, oxidación y reducción, estimulación del sistema inmune, etc.

Por lo tanto, los modelos de cultivo celular para los estudios relacionados con el cáncer deben incluir estos parámetros o líneas de investigación, aunque obviamente, un solo sistema de cultivo celular no podrá englobarlo todo (Palozza, et al., 2008). Además, los ensayos para determinar las propiedades quimiopreventivas o anticancerígenas de los diversos compuestos antioxidantes suelen realizarse con células malignas y no malignas para comparar las respuestas obtenidas, evaluar la selectividad de los nuevos compuestos y determinar la diferente sensibilidad en términos de inhibición del crecimiento e inducción de apoptosis entre células tumorales y no tumorales (Kryston et al., 2011)

2.2 Antecedentes de investigación

❖ **Antecedentes Internacionales**

Lee et al (2004), en una de sus publicaciones sobre estudios de actividad antioxidante en frutas, señaló que el oxígeno es esencial para los organismos vivos. Sin embargo, la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico. Estas especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, lípidos y ADN. No obstante, el organismo tiene sus

propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de ERO. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento.

Weng & Yen (2012); Vanzour *et al.*, (2010) demostró que los polifenoles pueden ejercer un efecto protector antioxidante por medio de la neutralización directa de radicales libres y de la quelación de metales. Además, mediante la interacción con las vías de señales celulares pueden estimular las defensas antioxidantes endógenas de las células. En conjunto, a través de estos mecanismos de protección celular, se limita el riesgo de daño oxidativo producido por los radicales libres que contribuyen a la patogénesis de diversas enfermedades

Ramos *et al.*, (2005); Martínez, (2005), concluyó que existen numerosos compuestos polifenólicos que tienen efectos duales en la modulación de la proliferación celular de manera dosis dependiente. Así, el consumo moderado de una dieta diaria rica en frutas y verduras puede ayudar a prevenir el establecimiento y la progresión de numerosos tipos de cáncer. Muchos de los polifenoles encontrados en estos alimentos ejercen efectos protectores contra el desarrollo del cáncer, especialmente en el tracto gastrointestinal donde los polifenoles pueden encontrarse en grandes concentraciones. Por otro lado, los efectos pro-oxidantes de los polifenoles, alcanzados con dosis farmacológicas pueden inducir apoptosis evitando el desarrollo del crecimiento tumoral

Van-Poppel & Tombal (2011), realizó un estudio de la incidencia y mortalidad del cancer de próstata que mostró una fuerte variación en el mundo con las más altas tasas en América del norte, Europa del este y norte, siendo las más bajas tasas en Japón y países asiáticos. Estas variaciones han sido estudiadas y los factores nutricionales fueron los que juegan un rol, junto con la genética; hábitos y estilos de vida. Desde que el cáncer de próstata típicamente se desarrolla en la edad adulta, se

han identificado compuestos botánicos para prevenir la progresión de la enfermedad que podrían tener un efecto positivo en la calidad de vida y reducir los altos costos en salud en la población de la tercera edad

De acuerdo al Instituto Nacional del Cáncer aproximadamente 400 compuestos han sido anunciadas como agentes quimiopreventivos y 40 de estas sustancias se encuentran en ensayos clínicos, algunas de ellas sobre el cáncer de próstata.

Waltheria ovata Cav., es una especie vegetal conocido con el nombre vulgar de “lucraco” en la provincia de Ica, es un arbusto originario de los países de Ecuador y Perú, pertenece a la familia esterculaceae y la raíz es usada por sus propiedades medicinales, en la inflamación de la próstata (**Whaley et al., 2010**). Como medicina alternativa ha sido empleado para el tratamiento de diversas condiciones en la inflamación, reumatismo, problemas circulatorios y deficiencias del sistema inmunológico (**Thammanna et al., 1994**).

Gressler et al., (2008), aisló tres flavonoides de la planta entera de *W. indica*. Estos compuestos inhiben la producción dosis dependiente significativamente de mediadores inflamatorios como óxido nítrico (NO), interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

Zongo et al., (2013) evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria lanceolata* demostrando una inhibición de la cepa *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

❖ Antecedentes Nacionales

Al presente no existen estudios reportados sobre alguna actividad farmacológica de la especie *Waltheria ovata*.

En la ciudad de Ica esta planta es administrada a la población con enfermedad a la próstata, en forma de bebida haciendo un cocimiento de la raíz.

2.4. BASES TEORICAS

2.4.1. Sistemas de defensa antioxidante

En un sistema biológico, un antioxidante es capaz de reaccionar con radicales libres siendo entonces un terminador de cadena oxidativa. La capacidad antioxidante de una sustancia o molécula se define como la habilidad para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, lipoperoxidación). La capacidad antioxidante está determinada a su vez por: a) reactividad química del antioxidante asociada a la actividad antirradicalaria o estabilizadora de radicales libres; b) capacidad para acceder al sitio de reacción y; c) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres (**Craig., 2009**).

Ante un incesante daño que ejercen los radicales libres en los sistemas vivos la naturaleza ha brindado diferentes fuentes de protección que permiten mediar este daño.

Estos sistemas, de acuerdo a su origen, pueden clasificarse como endógenos y exógenos (**Ver figura 01**).

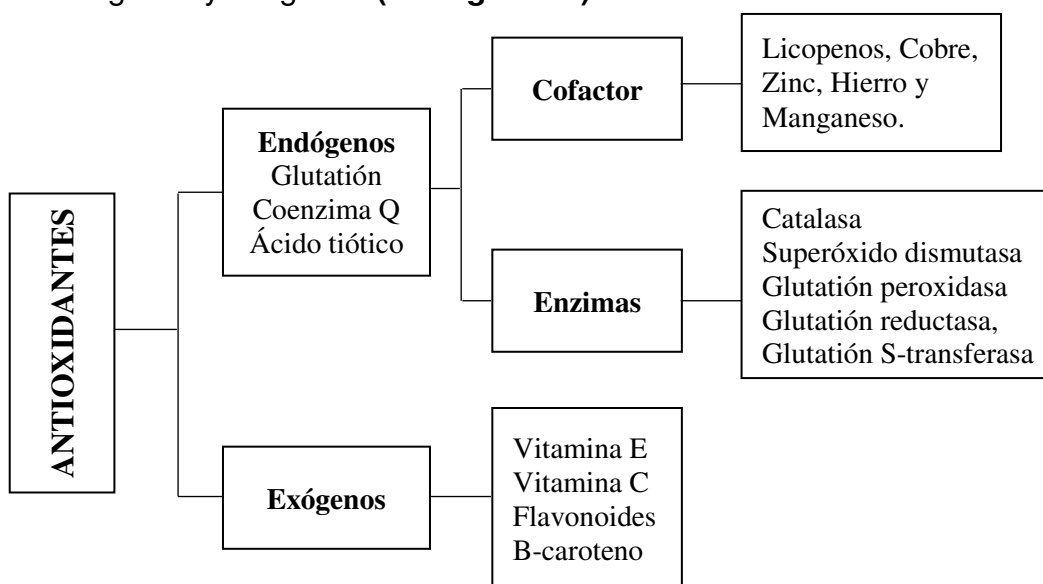


Figura 1. Clasificación de los antioxidantes (Craig, 2009)

Los sistemas de defensa antioxidante endógeno consisten en una serie de elementos biológicos que brindan protección ante la producción continua de radicales libres generados por funciones celulares como la

respiración y síntesis de ATP a nivel mitocondrial; el sistema antioxidante endógeno, a su vez, se divide en enzimático y no enzimático. El primero lo constituyen las enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión S-transferasa, entre las más importantes. El segundo lo integran el glutatión, la coenzima Q y el ácido tiotico o lipoico. El sistema de defensa antioxidante exógeno se forma por todos los elementos provistos del medio ambiente (alimentos, plantas, etc.) que han sido sometidos a estudios científicos y se les ha identificado actividad antioxidante. Entre los más estudiados se encuentran la vitamina E, vitamina C, β -carotenos y polifenoles (Martínez-Flores, et al., 2002).

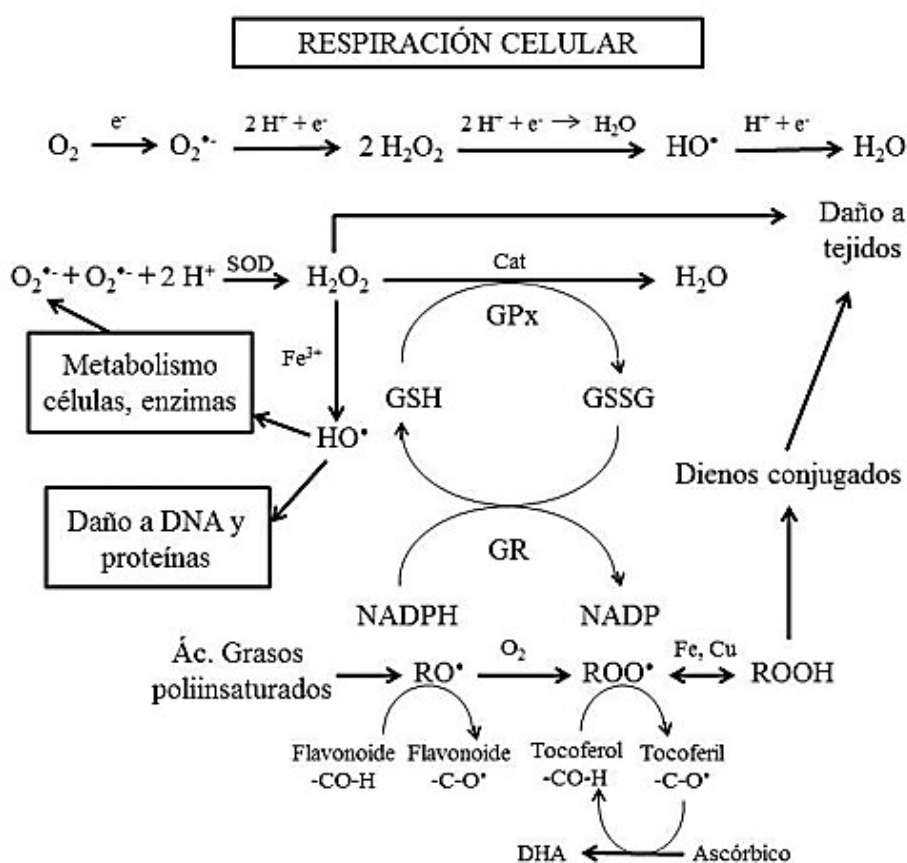


Figura 2. Representación de las principales rutas metabólicas productoras de radicales libres.

(Martínez-Flores et al., 2002)

2.4.2. Sistemas de defensa antioxidante endógeno.

❖ Enzimas antioxidantes.

Las enzimas antioxidantes forman parte del sistema de defensa antioxidante endógeno de los organismos y ha surgido a lo largo de la evolución de las especies como mecanismo de protección frente al daño originado por ROS. Los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante consisten en una serie de enzimas que actúan coordinadamente: las superóxido dismutasas dependientes de cobre y zinc (CuZnSOD) y manganeso (MnSOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y el enzima málico (ME). En la **Figura 03** se muestra la acción y coordinación de estos sistemas y su relación con el ciclo redox del glutatión (**Pérez, 2003**).

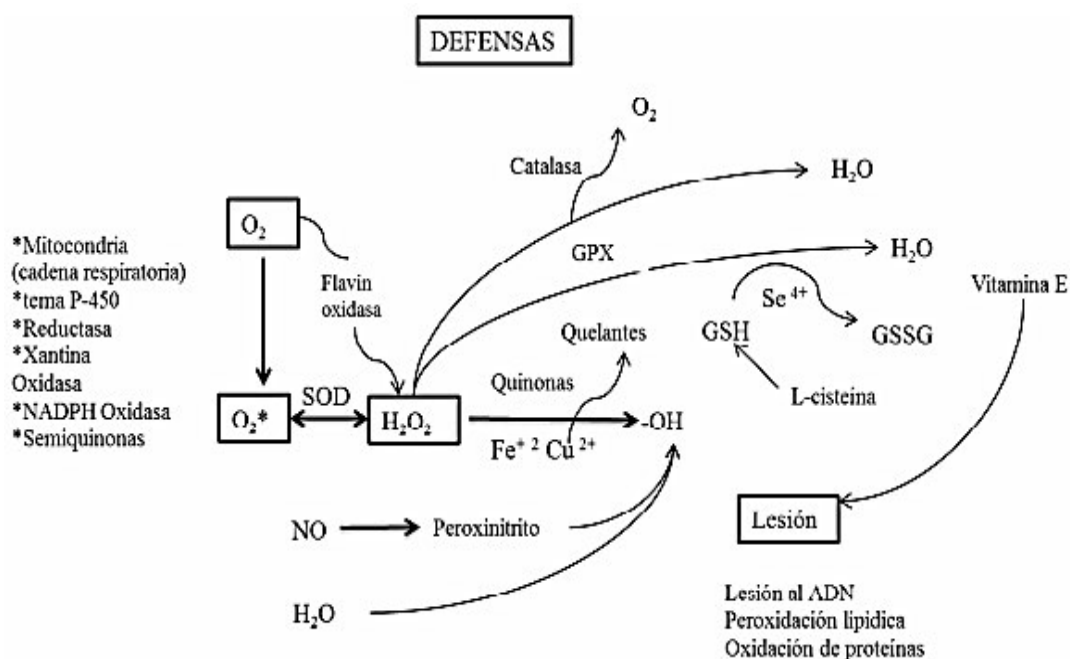
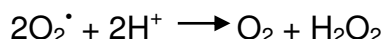


Figura 3. Detoxificación de las especies reactivas de oxígeno por sistemas enzimáticos de defensa antioxidante (SOD, catalasa y GPx) (Pérez, 2003)

❖ **Superóxido dismutasa (SOD).**

La SOD es un componente muy importante del sistema antioxidante, su función consiste en catalizar la dismutación del O_2^{\bullet} a H_2O_2 en la siguiente reacción:



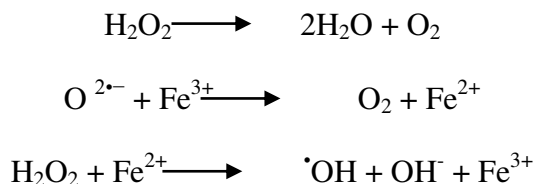
La familia de las SOD se conforma por las SOD dependiente de Cu y Zn (CuZnSOD) que se encuentra en el citosol de las células eucariotas, la SOD dependiente de Mn (MnSOD) localizada en la matriz mitocondrial en eucariotas y la SOD dependiente de Fe (SOD) en bacterias aerobias (Madhu, et al., 2012).

El O_2^{\bullet} se forma como producto de la cadena de transporte electrónico en los complejos I y III, es sabido que bajo condiciones normales existe una producción de ROS bien tolerada por la economía celular pero el aumento desmedido de estas especies radicalarias genera estrés oxidativo que provoca daño en diversas estructuras celulares, lipoperoxidación de membranas y daño al DNA lo cual conlleva a envejecimiento prematuro y enfermedades asociadas a éste como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes y carcinogénesis (Alimirah, et al., 2006).

❖ **Catalasa (CAT).**

Es una de las enzimas que interviene en la protección y el mantenimiento del balance oxidante/antioxidante. La catalasa (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa) es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía en dependencia del tejido; ésta resulta más elevada en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol. Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kD.

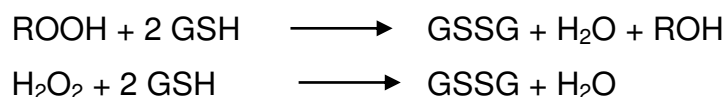
Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. En ausencia de esta enzima el H_2O_2 acumulado reacciona con metales como Fe^{2+} y Cu^{2+} que se encuentran en el medio para producir el radical $\cdot\text{OH}$, este tipo de reacciones se les conoce como Fenton.



Esta función es compartida con la enzima glutatión peroxidasa que no requiere de cofactores. En general las bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de peroxidases, mientras que las altas concentraciones de peróxido son preferentemente catalizadas por la catalasa (Hari, et al., 2013).

❖ Glutatión Peroxidasa (GPx).

Fue descubierta por Mills en 1957. Es una selenoproteína que, en las células animales, se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. En presencia de GSH como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente, cataliza la reacción de oxidación del GSH a GSSG a expensas de H_2O_2 o de peróxidos orgánicos. Las reacciones son las siguientes:

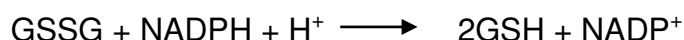


En esta familia de proteínas existe la GPx dependiente de Selenio que actúa sobre hidroperóxidos de lípidos y la GPx no dependiente de Selenio que es dimérica de menor peso molecular y se relaciona con las Glutatión S-transferasas porque participa en la eliminación de xenobióticos (Webster, et al., 1996).

❖ Glutatión Reductasa (GR).

La GR fue observada por primera vez por Hopkins y Elliot en 1931, posteriormente fue aislada del hígado de conejo en 1932. Cataliza la reacción de restauración del glutatión en su forma reducida con la

presencia de equivalentes reductores de NADPH. La reacción en la que participa es la siguiente:



❖ **Glutación.**

El glutatión (γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina) es el compuesto tiólico no proteico más cuantioso en las células. El hígado es el órgano donde se encuentra más abundantemente (5-10 mM). Existe en forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG) en una proporción de 100 a 1. En las células se haya en tres reservorios en el citosol en un 90%, en la mitocondria en 10% y una pequeña cantidad en el retículo endoplásmico. Se forma básicamente en dos pasos, primero a partir de glutamato y cisteína es producida γ -glutamylcisteína por acción de la γ -glutamylcisteína sintetasa, después la enzima GSH sintetasa utiliza γ -glutamylcisteína y glicina para formar GSH, estas reacciones se llevan a cabo en presencia de ATP. Se ha descrito previamente a este compuesto como potente antioxidante y agente reductor ya que puede reaccionar con diversas moléculas electrofílicas y oxidantes como H_2O_2 , O_2^\bullet y $^\bullet\text{OH}$. Se le ha asociado también con procesos fisiológicos entre los que destaca el metabolismo de xenobióticos, reacciones de intercambio de grupos tiólicos y procesos de señalización en los que está implicado el ciclo celular, proliferación y apoptosis. Debido a su poder reactivo el GSH es fácilmente reducido gracias a la presencia de sustancias químicas hepatotóxicas induciendo peroxidación lipídica, desestabilización de estructuras y daño celular (Naz et al., 2012).

2.4.3. Sistemas de defensa antioxidante exógeno.

Los antioxidantes exógenos están presentes en fármacos y en la dieta incluyendo frutas, verduras, semillas, granos, especias, etc. El término Fitoquímico es la denominación genérica que reciben los compuestos orgánicos presentes en alimentos y plantas, muchos de ellos poseen un elevado potencial antioxidante. Estos compuestos antioxidantes conforman un heterogéneo grupo de moléculas capaces de capturar radicales libres que producen especies menos dañinas reduciendo el nivel de estrés oxidativo. Los compuestos más estudiados son la vitamina E, vitamina C, algunos minerales como el selenio, cobre, zinc y magnesio, los β -carotenos y los polifenoles entre los que se incluyen los taninos y flavonoides (Céspedes & Sanchez, 2000).

❖ Vitamina C (Ácido Ascórbico).

Se encuentra bajo la forma de ascorbato, distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con los radicales libres (RL) superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos. Este proceso transforma el ascorbato en el RL deshidroascorbato. El retorno a su forma nativa es por acción enzimática o por sustratos celulares tiólicos. A pesar de su manifiesta propiedad antioxidante, el ascorbato puede desempeñarse como un potente prooxidante en presencia de excesivas concentraciones de iones Fe^{+3} y Cu^{+2} . Hay estudios que sugieren que su acción antioxidante contra el estrés oxidativo de la mucosa gástrica puede deberse a la vitamina C, al ser un potente antioxidante soluble en agua atrapa y neutraliza una variedad de especies reactivas del oxígeno, como hidroxilo, alcoxilo, peroxilo, anión superóxido, radicales hidroperóxilo y radicales reactivos del nitrógeno a concentraciones muy bajas; además puede regenerar otros antioxidantes como el alfa-tocoferoxilo y el beta-caroteno a partir de sus especies radicales. Otros estudios han demostrado que el ácido ascórbico es además inhibidor de la nitrosación con potencial importancia como eliminador de nitritos *in vivo*, permite disminuir los riesgos de aparición de cáncer de estómago y esófago, aumenta la función inmunológica al aumentar las células natural

Killer y la función de los linfocitos T y B, inhibe el crecimiento de distintas células de melanoma humano e induce apoptosis en células leucémicas promielocíticas HL-60 y en fibroblastos de seres humanos, combate el cáncer al promover la síntesis de colágeno y prevenir así que los tumores invadan otros tejidos; y se ha sugerido que un complemento diario de 1 g de vitamina C podría proteger a las personas contra la mutagénesis inducida por la quimioterapia (Céspedes & Sanchez, 2000).

❖ **Vitamina E.**

Su nombre genérico hace referencia a sus ocho isómeros estructurales de tocoferol, de los cuales el α -tocopherol es el isómero de mayor potencia antioxidante y, junto el γ -tocopherol, se le considera esencial en la defensa celular. Para estabilizar un RL, el tocoferol se convierte en el RL tocoferoxilo, este retorna a su estado original a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A. Algunos investigadores sostienen que una sobreproducción de ERO puede llevar a una disminución significativa de la concentración tisular de vitamina E.

Se ha comprobado que la vitamina E es el antioxidante más concentrado que se encuentra en las LDL, en una cantidad 20 a 300 veces mayor que cualquier otro antioxidante. *In vitro* la vitamina E inhibe la oxidación de las LDL y su acción es superior si la suplementación combina ésta vitamina con la vitamina C y el beta caroteno (Hari, et al., 2013).

❖ **Vitamina A.**

Es un término genérico que abarca a los compuestos de origen animal que presentan actividad biológica de vitamina A. En los vegetales, existe como provitamina llamada β -caroteno. Por su conformación estructural son excelentes capturadores de RL. Protegen contra los radicales libres, sobre todo la inducida por el sistema de la xantina oxidasa, y elimina el ión superóxido y radicales peroxilo. Al igual que la vitamina C, tiene un comportamiento dual al actuar como prooxidante en condiciones de altas presiones parciales de oxígeno.

❖ **Flavonoides**

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, tales como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, entre otras. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Benitez, 2006). Estos compuestos están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras, café, cocoa, té verde, té negro, cerveza y el vino rojo.

En las plantas, los flavonoides se encuentran como O ó C-glucósidos. Los O-glucósidos presentan sustituciones de azúcares, las cuales están unidos a los grupos hidroxilo de las agliconas, generalmente, las posiciones C-3 o C-7, mientras que los C-glucósidos, los grupos de azúcar están unidos a carbonos de la aglicona, usualmente C-6 o C-8. Los carbohidratos más comunes son ramnosa, glucosa, galactosa y arabinosa.

El reciente interés en los flavonoides se debe a su amplia actividad farmacológica, ya que poseen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C y topoisomerasa II. Entre todas, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los cuales han sido objeto de un sin número de estudios principalmente de corte clínico y nutricional (Benitez, 2006).

➤ **Clasificación de los flavonoides.**

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenil-piranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se

enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 1' al 6', como se aprecia en la **Figura 04**.

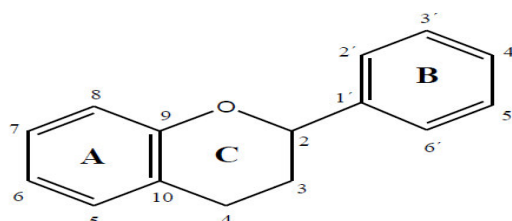


Figura 4. Estructura básica de flavonoides y sistema de numeración. (Benitez, 2006)

Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. Existen 13 subclases de flavonoides con un total de 5000 compuestos conocidos aproximadamente. (**ver figura 05**).

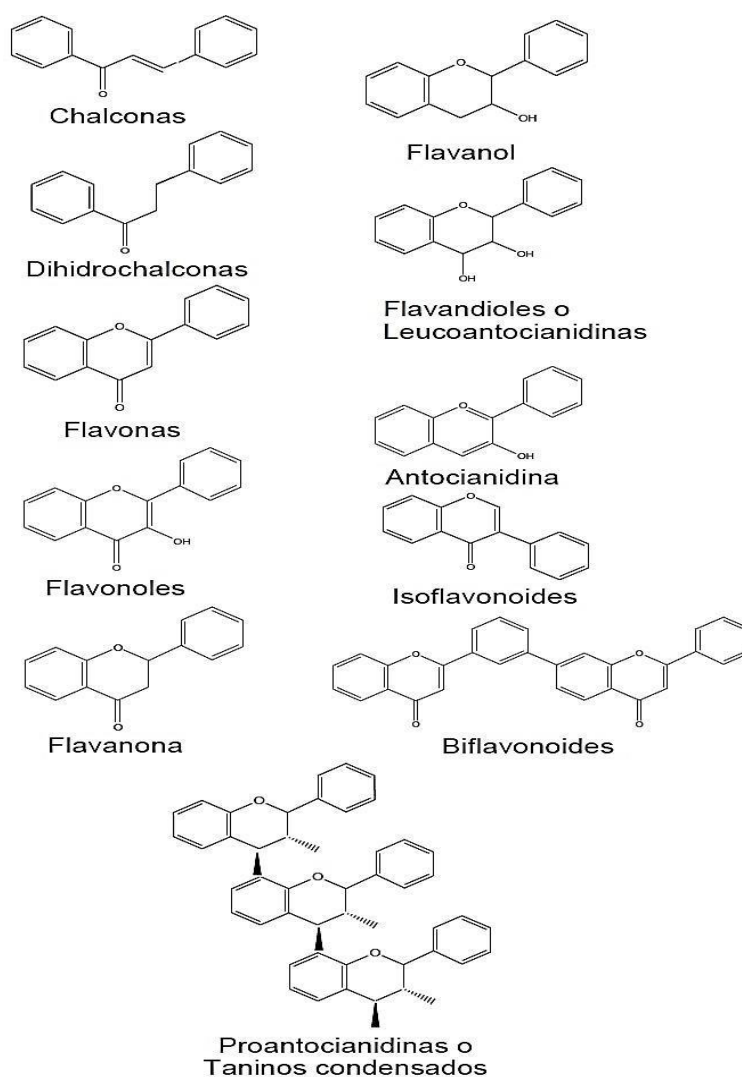


Figura 5: Subclases de flavonoides (Benitez, 2006)

➤ **Síntesis, absorción y metabolismo de flavonoides.**

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de la luz de la fotosíntesis, durante el cual catalizan el transporte de electrones.

La entrada en la ruta de los fenilpropanoides (**Ver figura 06**), se produce por la acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL). Esta enzima, mediante un proceso de desaminación oxidativa, actúa sobre la L-fenilalanina (L-Phe) dando lugar al ácido cinámico.

Posteriormente, mediante la acción de la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), el ácido cinámico es convertido al ácido p-cumárico, el cual es activado en forma de p-cumaroil-CoA gracias a la 4-cumaroil-CoA-ligasa (4CL).

A su vez, la ruta del acetato-malonato se inicia con la formación de malonil-CoA, a partir de acetil-CoA, mediante la acetil-CoA-carboxilasa (ACC). El primer paso en la biosíntesis de flavonoides es una condensación secuencial del p-cumaroil-CoA, como molécula iniciadora, con tres moléculas de malonil-CoA y posterior condensación intramolecular de Claisen, catalizado todo por la chalcona sintasa (CHS), que da lugar a la naringerin chalcona (familia de las chalconas), molécula de estructura C6-C3-C6, precursora de todos los flavonoides hallados en el reino vegetal. El metabolismo de los flavonoides es complejo y una parte importante se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucorónico, sulfatos o glicina, parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina (Green, 2007).

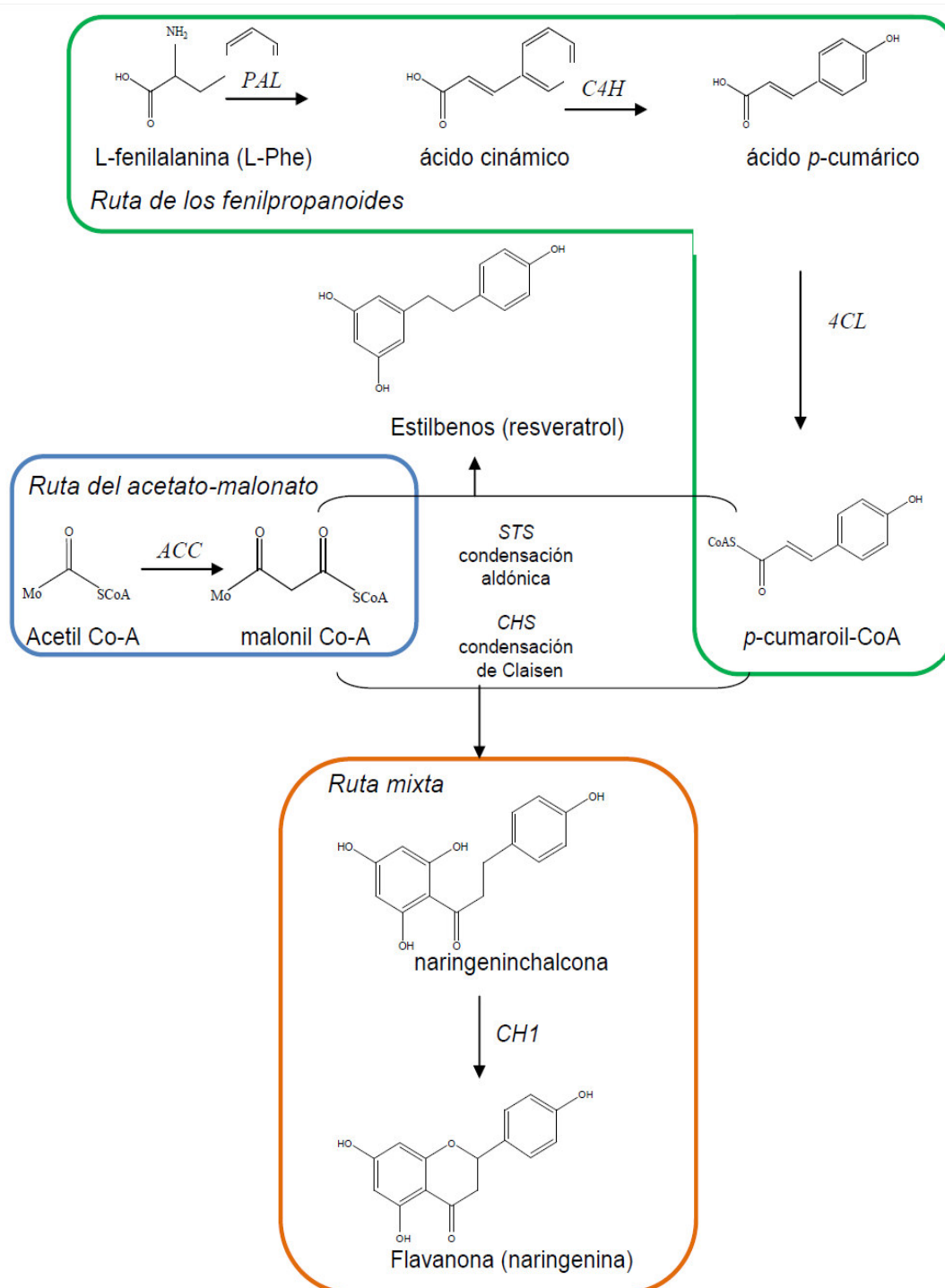


Figura 6. Biosíntesis parcial de flavonoides tipo flavonona. (Green, 2007)

➤ **Mecanismos antioxidantes y relación estructura-actividad de los flavonoides.**

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes del hierro y secuestradoras de radicales libres. La inhibición sobre determinadas oxidasas representa otro de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus actividades antioxidantes. Tal es el caso de la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO), que evitan la generación de las ERO *in vivo*, así como de hidropéroxidos orgánicos. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2). Al mismo tiempo que estimulan otras con actividad antioxidante reconocida, tales como: la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD). De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación del radical libre y en la formación del radical en sí.

Los flavonoides secuestran aniones superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$), también inhiben los efectos degradativos provocados por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

En el caso particular de los flavonoides, el estudio de la relación estructura-actividad es complicado, debido a la relativa complejidad de las moléculas. Algunas de las características estructurales que determinan la actividad antioxidante se presentan a continuación (ver figura 07):

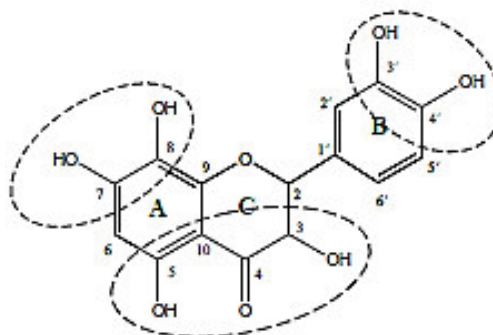


Figura 7: Características estructurales de flavonoides con actividad atrapadora de radicales libres (Green, 2007).

La posición del grupo OH en el anillo B; en particular, una estructura orto-dihidroxilo (grupo catecol) produce una elevada actividad, ya que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; actuando además como sitio de fijación preferida para trazas de metales. La presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B (grupo pirogalol) ha sido reportada por incrementar la actividad antioxidante, en comparación con la de flavonoides que contienen un simple grupo hidroxilo. Sin embargo, bajo las mismas condiciones, tales compuestos pueden actuar como prooxidantes, neutralizando el efecto antioxidante.

Un doble enlace entre los carbonos C-2 y C-3, conjugado con el grupo 4-oxo, en el anillo C, la presencia adicional de grupos hidroxilo en posición C-3 y C-5 incrementa la capacidad captadora de radicales de los flavonoides. Un doble enlace entre C-2 y C-3, combinado con un 3-OH, en el anillo C, incrementa también la capacidad captadora de radicales libres, como es el caso del canferol. Una sustitución del grupo 3-OH produce un incremento del ángulo de torsión y una pérdida de coplanaridad y, subsecuentemente, una reducción de la actividad antioxidante. La sustitución de grupos hidroxilo en el anillo B por grupos metoxilos altera el potencial redox y la capacidad captadora de radicales de los flavonoides. Grupos 3-OH y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C son necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

La eficiencia antioxidante está directamente relacionada con el grado dehidroxilación, pero este disminuye con la presencia de un enlace de azúcar.

A través de numerosas investigaciones se ha evaluado la actividad antioxidante de los flavonoides frente a los radicales libres generados durante la peroxidación lipídica, ya sea enzimática o no enzimática. Existen estudios basados en la medición de la producción de malonildialdehído (MDA) a través del ensayo de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Casi todos los resultados coinciden en que los flavonoides con sustituyentes

dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B son más activos y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4; como sucede con la quercetina (Wang et al., 2011).

2.4.4. Determinación de capacidad antioxidante *in vitro*.

El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen un gran número de métodos para determinar la capacidad antioxidante de extractos.

Sin embargo, es difícil determinar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método, es por eso que en la actualidad se combinan varios. Esto se debe a varias razones; en primer lugar, los antioxidantes pueden ejercer su acción mediante mecanismos muy diversos; pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, capturar radicales libres, quelar metales, formar complejos, reducir algunos compuestos, inducir la actividad de sistemas biológicos antioxidantes, y en un mismo extracto puede haber mezclas de diferentes antioxidantes con distintos mecanismos de acción y entre los que, además, se pueden establecer reacciones sinérgicas, por lo que serán necesarios distintos análisis para poder considerar los posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes (Estevez et al., 2008).

Por otro lado, además del mecanismo de reacción, existen otros factores que también deben considerarse al determinar la capacidad antioxidante de muestras tan complejas como son los extractos de vegetales, tales como las propiedades coloidales del sustrato, el estado de oxidación y la localización del antioxidante en las distintas fases, la composición del sistema, el tipo de sustrato oxidable, el modo de provocar la oxidación, la naturaleza heterogénea y heterofásica del sistema, las interacciones con otros componentes, etc.

Por todas estas razones, un gran número de autores han planteado la necesidad de combinar más de un método de medida en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*.

En cualquier caso, todos los ensayos *in vitro* sobre capacidad antioxidante de extractos de plantas, deben completarse con ensayos *in vivo*, así como con estudios sobre el posible efecto prooxidante de estos compuestos a dosis elevadas, ya que en estos compuestos existe un delicado equilibrio entre actividad antioxidante y prooxidante (Kerry & Abbey, 1998).

Otro aspecto a considerar en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* es que, debido a las múltiples modificaciones hechas en cada uno de los métodos existentes, muchas veces la comparación entre resultados, aun correspondiendo al mismo método de medida, se deben efectuar con precaución, ya que pueden haber existido cambios en la manipulación, en la temperatura del ensayo, en la variedad de la muestra o sus condiciones de procesado, en el modo de combinar las muestras con los reactivos (por ejemplo, tiempo de exposición de los compuestos activos a los reactivos, etc.), en la metodología empleada en la extracción (tamaño de partícula, ciclos de extracción, modo de agitación de la muestra, relación muestra: solvente, etc.). Así mismo, el hecho de que en el sistema a analizar haya una alta o una baja actividad de agua es también importante, ya que este factor afecta a la migración de compuestos, puede producir fenómenos de cristalización, coalescencia, complejación, colapsos de estructuras, etc. Además, se debe tener en cuenta el hecho de que, en la literatura, los resultados para un mismo método se expresan de múltiples formas, lo que dificulta su comparación (Lu, et al., 2011).

➤ **Reacciones SET y reacciones HAT.**

Aunque, como se ha explicado, existen una gran cantidad de mecanismos por los que los antioxidantes reaccionan con los radicales libres, como en el caso de los polifenoles, que detienen el proceso en cadena de oxidación lipídica (chain- breaking), esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET), aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar un método de medida de capacidad antioxidante,

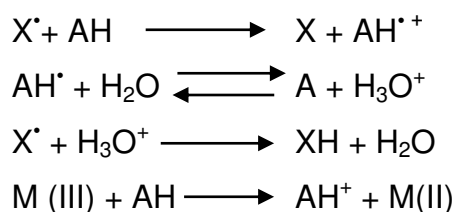
por lo que, a continuación, se explicará brevemente en qué consiste cada uno de estos dos mecanismos.

En las reacciones HAT, la reacción sería de este tipo, siendo X^\bullet el radical libre y AH el antioxidante:



El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial.

Por el contrario, en las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, y serían reacciones de este tipo, siendo de nuevo X^\bullet el radical libre y AH el antioxidante:



Estas reacciones son también dependientes del pH. Son métodos muy sensibles al ácido ascórbico y al ácido úrico, que juegan un papel importante en el mantenimiento del status redox del plasma. Algunos elementos traza y contaminantes (sobre todo metales) pueden interferir con estos métodos, resultando en una alta variabilidad y una baja reproducibilidad y consistencia de los resultados (Heim, et al., 2002).

Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpía de disociación, de manera que un compuesto que tuviera baja entalpía facilitaría la abstracción del átomo de H. Así mismo, se ha observado que ciertos aspectos estructurales, como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación de un radical estable. Por el contrario, las reacciones SET dependen del potencial de ionización.

A continuación, se describen tres de los métodos utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante, indicando el tipo de reacción que se lleva a cabo en aquellos (Poljšak, et al., 2006)

➤ **Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP).**

Se trata de una reacción SET, que se basa en la reducción del complejo de la tripiridiltiazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido. Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 593 nm durante 4 minutos, según el método original, aunque este tiempo fue posteriormente ampliado hasta 30 minutos, ya que a los 4 minutos muchos compuestos todavía no habían acabado de reaccionar. Los resultados se expresan en equivalente Trolox ($\mu\text{mol Trolox/g}$ o $\mu\text{mol Trolox/L}$), tras elaborar una curva de calibración de este compuesto, un análogo hidrosoluble de la vitamina E muy utilizado en la expresión de resultados de capacidad antioxidante.

La **Figura 08** muestra la reacción que tiene lugar en este método de medida de capacidad antioxidante.

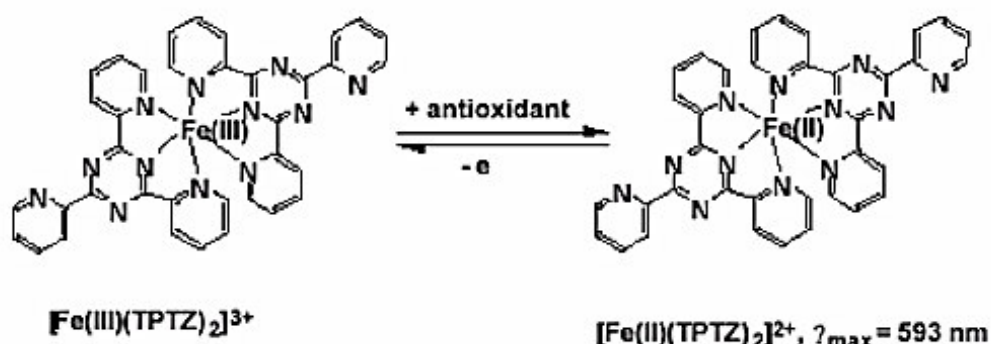


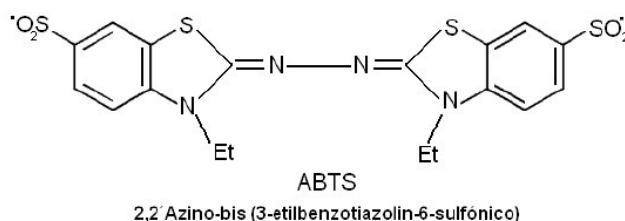
Figura 8. Mecanismo de reacción en el método FRAP. (Beanzie & Strain, 1995)

Se han planteado diversas críticas a este método:

- Se lleva a cabo a un pH no fisiológico.
- Como el potencial de reducción del Fe (III) a Fe (II) es de 0,77 V, cualquier compuesto con un potencial redox inferior podría reducir al Fe (III), sobreestimando el valor de FRAP.
- A 593 nm pueden absorber otros compuestos, como la bilirrubina oxidada, que produce biliverdina, aumentando el valor de FRAP.
- Hay compuestos como el ácido ascórbico que, además de reducir el ion férrico a ferroso, pueden reaccionar con éste último para generar nuevos radicales libres. Por ejemplo, en fluidos biológicos, el Fe (II) puede interaccionar con agua oxigenada para producir radical hidroxilo.

- El FRAP no implica a ningún prooxidante ni a ningún sustrato oxidable. Igual que no todos los reductores que transforman el ion ferroso en férrico no son antioxidantes, hay antioxidantes que no son capaces de llevar a cabo esta reacción, como es el caso del glutatión, un importante antioxidante natural que da resultados negativos en el FRAP.
- **Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS).**

Se trata de una reacción SET y HAT, en el método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) el radical tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (persulfato potasio), enzimática (peroxidasa, mioglobulina) (**ver figura 09, 10**), o también electroquímica. Con este método, se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica. El cromóforo ABTS presenta un color azul/verde con máximo de absorción a λ 342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El radical ABTS^{•+} una vez generado por medio de enzimas o químicamente pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a λ (414, 645, 734 y 815 nm), pero se mide a una longitud de onda λ 734 nm. Una de las principales ventajas del uso de este radical es que tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y en medios orgánicos. El radical ABTS^{•+} es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los compuestos fenólicos, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (λ 734 nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria.



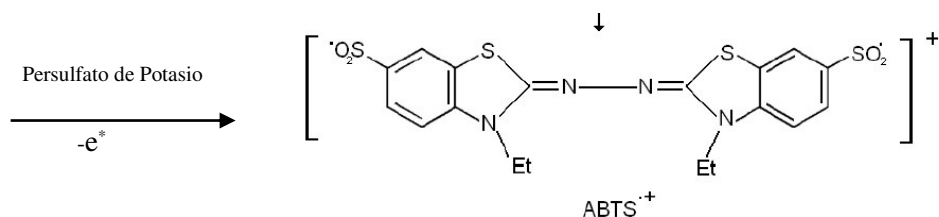


Figura 9. Formación del radical ABTS (Pellegrini, 2003)

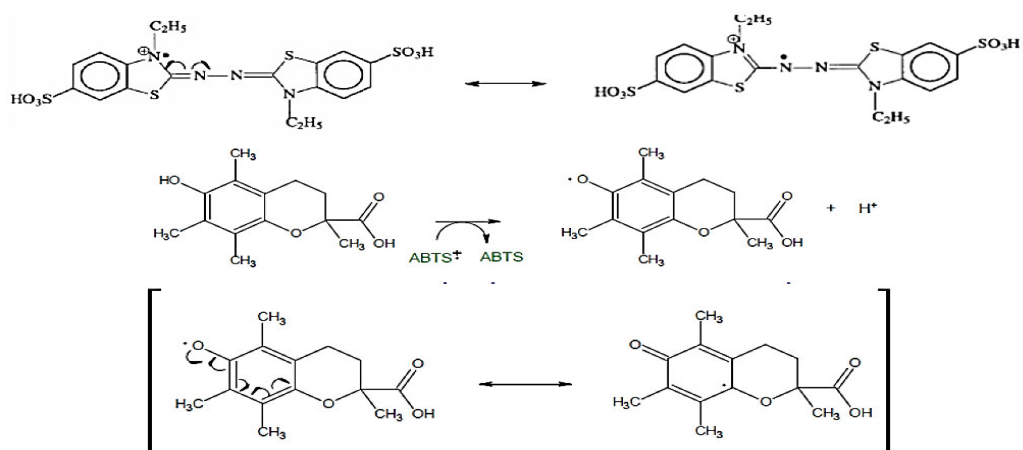


Figura 10. Mecanismo de estabilización del catión radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (arriba), reacción del catión radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ con el trolox (centro) y mecanismo de estabilización del radical formado en el trolox (abajo) (Pellegrini, 2003).

- **Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH).** El método del DPPH se basa en la reducción del radical DPPH^{\cdot} por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes (**ver figura 11**). La decoloración del radical se determina a una λ de 515 nm hasta alcanzar el equilibrio. Entre las ventajas de usar este método, se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido, sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado. La desventaja que tiene este método es que sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH.

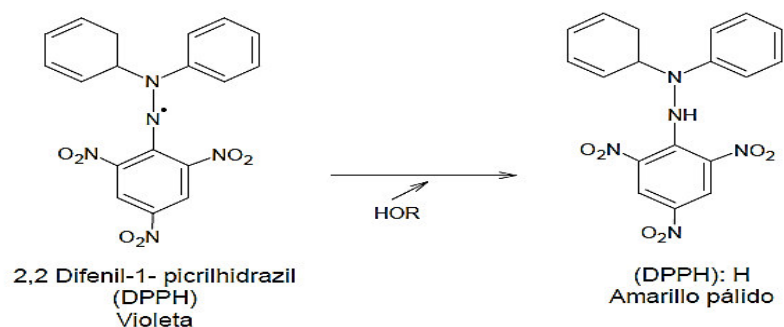


Figura 11. Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Brands & Williams, 1995)

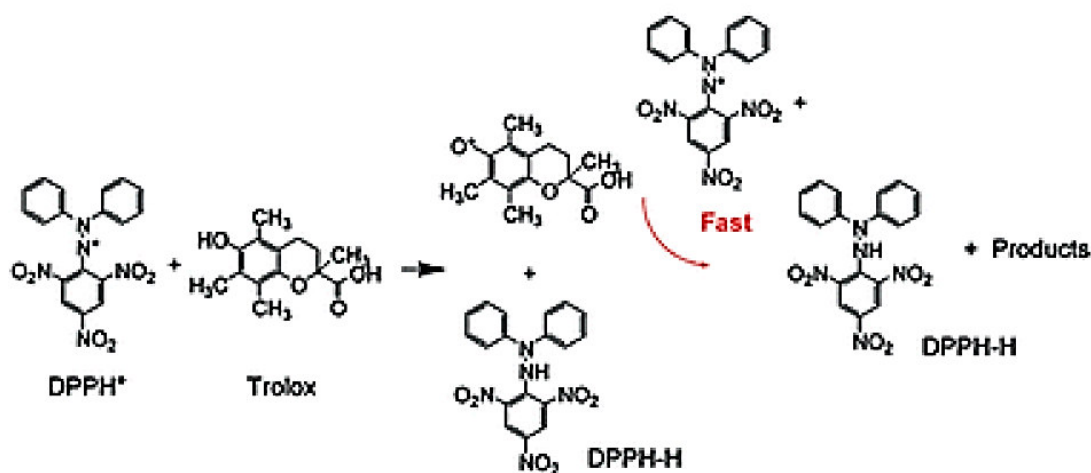


Figura 12. Mecanismo de reacción del radical DPPH con el estándar Trolox. (Brands & Williams, 1995)

➤ Trolox.

Es un antioxidante como la vitamina E y se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo o daño celular.

El compuesto ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico, Trolox (**ver figura 13**), es un análogo soluble en agua de la vitamina E, que se puede comparar con varios antioxidantes comerciales.

Las reacciones entre el Trolox y varios radicales libres oxidantes incluyendo los radicales peroxi y varios radicales hidroxilo se examinaron mediante el uso de la técnica de pulso-radiólisis, demostrando que el Trolox puede someterse a reacciones rápidas de transferencia de electrones, así como los procesos de transferencia de hidrógeno; el

radical fenoxilo resultante demuestra ser relativamente estable, en común con el radical fenoxi derivado de la vitamina E. Las reacciones entre el Trolox (radical fenoxilo) y una variedad de compuestos reductores biológicamente pertinentes se examinaron mediante el uso de radiolisis pulsos. Los resultados evidencian que el Trolox (radical fenoxilo) se repara fácilmente por el ascorbato y ciertos tioles, pero no por urato, NADH o galato de propilo. Las pruebas evidencian que el Trolox repara proteínas que se han oxidado por radicales libres.

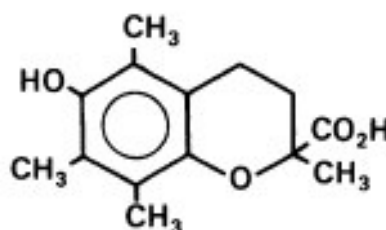


Figura 13. Fórmula estructural del trolox (Pellegrini, 2003).

2.4.5. Cáncer de próstata y estrés oxidativo

El carcinoma prostático es una enfermedad asociada con la edad (Malins *et al.*, 2001). Este estado junto con la predisposición genética, raza, factores ambientales, dieta, agentes infecciosos, exposición a andrógenos y otras hormonas producen un desbalance redox que conduce a un estado oxidativo mayor del tejido.

El rol del estrés oxidativo en el cáncer de próstata ha sido ampliamente reconocido (De Marzo *et al.*, 2003). Dicho estrés produce remodelamiento y proliferación del tejido. La inflamación aguda y crónica generada por especies reactivas de oxígeno (ROS) en el sitio de la inflamación, conlleva al daño de las estructuras celulares. La exposición al estrés oxidativo crónico debe ser uno de los posibles factores etiológicos en el desarrollo del cáncer (Jiang, et al., 2008).

La inflamación puede producir la destrucción de las células epiteliales de la próstata y esto puede conducir a un aumento de la proliferación como respuesta compensatoria a la muerte celular. Tal proliferación puede estar mecanísticamente relacionada a una disminución del inhibidor del ciclo

celular p27Kip1 como se observó en la atrofia inflamatoria proliferativa (PIA: focos de epitelio glandular proliferativo con la morfología de atrofia simple o hiperplasia prostática, ambas en relación con la inflamación crónica). La disminución de la apoptosis asociada con estos eventos puede también estar relacionada a un aumento de la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 (De Marzo et al., 1999).

Un aumento de estrés oxidativo y electrofílico en un ambiente de proliferación asociado con estos eventos, puede conducir a la elevación de la expresión de la isoforma P1 de la GST (GST-P1) como una medida protectora del genoma. Sin embargo, la metilación aberrante de las islas CpG del promotor del gen GST-P1 silencia la expresión y los niveles de proteína de este gen, provocando daño genético adicional, y acelerando la progresión hacia la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y carcinoma (De Marzo et al., 2003). En pacientes con cáncer de próstata, se han detectado alteraciones en la peroxidación lipídica con cambios concomitantes en el sistema de defensa antioxidante. Esto conduce a un balance pro oxidante–antioxidante alterado que puede producir un aumento del daño oxidativo y consecuentemente jugar un rol importante en la carcinogénesis de la próstata (Aydin et al., 2006).

El epitelio prostático con apariencia normal puede derivar en CaP clínicamente localizado y sensible a andrógenos a través de dos caminos. El epitelio normal puede sufrir alteraciones a nivel molecular en genes guardianes y derivar en lesiones neoplásicas intraepiteliales. Este proceso puede también proceder a través de la atrofia inflamatoria proliferativa. La inflamación crónica de larga duración se ha ligado al desarrollo de carcinoma en varios órganos y sistemas. La atrofia glandular prostática, se ha señalado como un precursor potencial del adenocarcinoma prostático y sucede en estrecha asociación con la inflamación crónica.. Alternativamente el CaP, puede desarrollarse a través de más de un camino derivado de PIA y PIN de alto grado.

Se han encontrado múltiples genes alterados y múltiples mutaciones en el RA en el CaP refractario a hormonas. Por lo tanto, el conocimiento del

estado oxidativo en el tejido prostático puede proporcionar una herramienta para la prevención o detección temprana del CaP.

2.4.6. Aspectos Generales de la familia Sterculiaceae.

La familia Sterculiaceae, en la actualidad, comprende aproximadamente 70 géneros y 1 500 especies, distribuidas entre árboles y arbustos que presentan flores hermafroditas o unisexuales apétalas y asépalas. Esta familia de plantas se puede encontrar en los países tropicales y subtropicales.

Waltheria douradinha es una especie integrante de la familia Sterculiaceae. Esta planta es originaria de Sur América, se encuentra en países tales como: Uruguay, Paraguay, Argentina y Sur de Brasil, donde es usada en el tratamiento de algunas enfermedades, como la bronquitis, laringitis y actúa como agente limpiador de heridas. En los estudios fitoquímicos realizados a esta especie, se aislaron nuevos alcaloides ciclos péptidos, tales como, waltherina A, B y C (Figuras 14,15,16); además de otros alcaloides conocidos como, escutanina B y adouetina Y'.

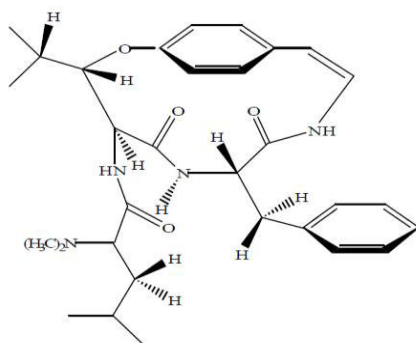


Figura 14. Estructura de waltherina A (Zongo, et al., 2013)

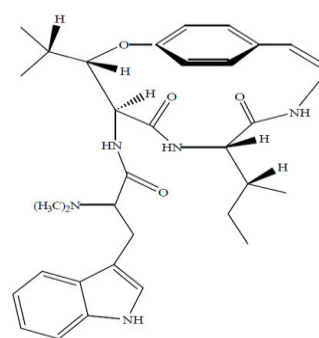


Figura 15. Estructura de waltherina B (Zongo, et al., 2013)

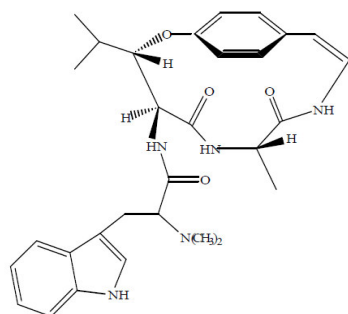


Figura 16. Estructura de waltherina C (Zongo, et al., 2013)

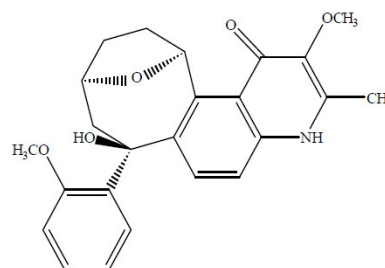


Figura 17. Estructura de waltherina A (Zongo, et al., 2013)

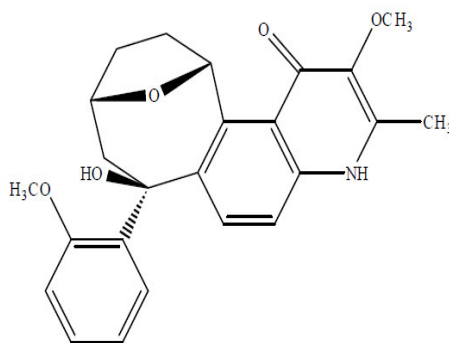


Figura 18. Estructura de walthersona B
(Zongo, et al., 2013)

En estudios más recientes sobre *W. douradinha*, se logró el aislamiento de alcaloides tipo quinolinonas llamadas: walthersona A, walthersona B, (figura 17, 18) vanessina, antidesmona y o-metiltembamida. En la evaluación de la actividad antimicrobiana de dichos alcaloides quinolinonas, sólo la vanessina presentó una débil actividad. Esta clase de alcaloides no es muy frecuente en la familia Sterculiaceae. Por ejemplo, en la literatura sólo se encuentran reportes sobre alcaloides melochinonas y melovinonas, ambos aislados de la *Melochia tomentosa* L, y las esterculininas I y II aisladas de la *Sterculia lychonophora* Hance.

Dentro del género *Waltheria*, se encuentra una especie ampliamente estudiada, llamada *Waltheria indica*, empleada por miles de años en Taiwán y otras ciudades Asiáticas, como tónico para el tratamiento de inflamaciones, protección del hígado, prevención del cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Esta planta también es empleada en algunas regiones de Sur África, en donde es usada en el tratamiento de la malaria, fiebre, enfermedades gastrointestinales y respiratorias.

Investigaciones químicas mostraron que esta planta contiene alcaloides ciclopeptídicos, flavonoides, flavonoides glicosilados y ácido cafeico; lográndose aislar y caracterizar dos flavonoides conocidos como: 2', 3', 5'- trihidroxi-3, 7, 4'-trimetoxiflavona (Figura 19) y 5,2'-dihidroxi-3, 7, 4',5'-tetrametoxiflavona (Figura 20).

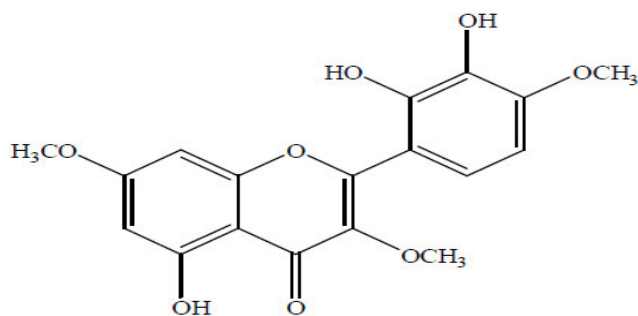


Figura 19. Estructura de 2', 3', 5-trihidroxi-3, 7, 4'-trimetoxiflavona.
(Zongo, et al., 2013)

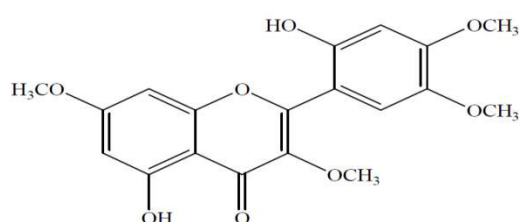


Figura 20. Estructura de 5,2'-dihidroxi-3, 7, 4', 5'-tetrametoxiflavona.
(Zongo, et al., 2013)

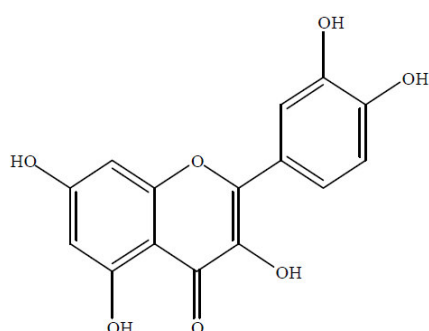


Figura 21. Estructura de quercetina
(Zongo, et al., 2013)

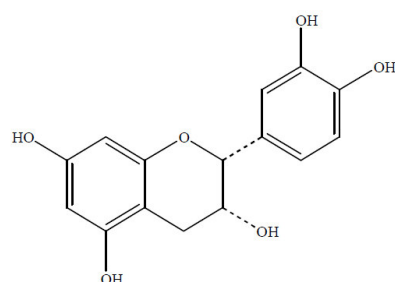


Figura 22. Estructura de (-)-epicatequina.
(Zongo, et al., 2013)

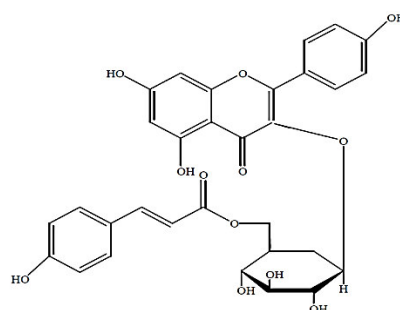


Figura 23. Estructura de la tilirosida
(Zongo, et al., 2013)

Otro estudio proporcionó información sobre los efectos anticancerígenos y antioxidantes de algunos flavonoides y

compuestos relacionados, aislados de *W. indica*. En esta investigación se determinó la acción proliferativa de la quercetina (Figura 21), (-)-epicatequina (Figura 22) y tilirosida (Figura 23) contra ciertas líneas celulares de tumores humanos.

La evaluación de la actividad antioxidante reveló que estos compuestos presentan un fuerte efecto frente al radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y mostraron un efecto moderado contra el radical superóxido (O_2).

En la actualidad, se hace necesaria la integración de la medicina tradicional moderna y afrontar integralmente la formulación de los fármacos de origen natural, que recoja el conocimiento popular y lo integre al conocimiento científico. Por esta razón, en Perú se pretende promover investigaciones más profundas, tanto en el campo, como en los laboratorios para lograr la industrialización de la raíz de la *W. ovata*, cuyas cualidades antiinflamatorias prostáticas, bajo su principio activo, que son las flavanonas, están otorgando resultados sumamente alentadores, en cuanto a su consumo y la apertura a nuevos mercados cuya tendencia es hacia la fitoterapia o medicina natural.

2.4.7. Células DU-145 (adenocarcinoma de próstata).

La línea celular DU145 se estableció a partir de células de cáncer de próstata humana. Estas células exhiben una morfología de células epiteliales y poseen potencial metastásico moderada. DU145 células son de uso general, junto con la línea celular PC3, en el estudio del cáncer de próstata, que afecta a muchas personas (especialmente los hombres mayores de 50). Esta línea celular es considerada uno de las líneas de cáncer de próstata "clásicos" de células cancerosas. Estas células no son sensibles a las hormonas y no expresan el antígeno prostático específico (PSA). DU-145 células son células adherentes epiteliales-como crecimiento en forma de monocapas.

La línea DU-145 no es medida en base a la cantidad de hormona sensible. Es sólo débilmente positiva para fosfatasa ácida y células

aisladas forman colonias en agar blando. Los análisis de la línea celular han revelado microvellosidades, tonofilamentos y desmosomas. DU-145 no expresan el antígeno de próstata, pero sí expresan activador del receptor funcional de NFkappaB y receptor de andrógenos. Se ha demostrado que la glucosamina suprime la proliferación de DU-145 (Alimirah et al., 2006)

III. METODOLOGIA

3.1 Tipología de la investigación

Es una investigación de tipo observacional, prospectivo, longitudinal.

3.2 Diseño de investigación

Es una investigación de diseño experimental.

3.3 Universo y Muestra del trabajo

3.3.1 Universo:

U1: Líneas celulares humanas: DU-145 (adenocarcinoma de próstata), línea celular animal: 3T3 (fibroblastos normales de ratón) cultivados en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (distrito de San Martín de Porres, Lima, Perú).

U2: Ratas Holtzman (200 ± 10 g de peso corporal), ratones albinos Balb/C-53 del bioterio del Instituto Nacional de Salud.

3.3.2 Muestra:

M1: La unidad experimental fue cada célula perteneciente a la línea celular humana: DU-145 (adenocarcinoma de próstata) y línea celular animal: 3T3 (fibroblastos normales de ratón).

M2: 20 Ratas de 08 semanas de edad con un peso de $200 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ de peso corporal de ambos sexos raza Holtzmann, procedentes del Instituto Nacional de Salud.

6 Ratones albinos de 08 semanas post destete con un peso aproximado de $25 \pm 5 \text{ g}$ de peso corporal, de ambos sexos cepa Balb/C.

3.4. Método operativo.

3.4.1. Determinación de los metabolitos secundarios mediante el screening fitoquímico preliminar del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco".

3.4.1.1. Obtención del extracto etanólico y screening fitoquímico (Lock de Ugaz, 1994).

- **Recolección y selección de la muestra.**

La raíz de *Waltheria ovata* Cav. se recolectó en el distrito de Yauca del Rosario ubicado a 14°02'26"S y 75°45'04"W de latitud y longitud, a una elevación de 421 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), provincia de Ica, departamento Ica en el mes de Noviembre del 2012.

Posteriormente la muestra vegetal fue clasificada botánicamente en el Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el biólogo Mario Benavente con N° de constancia (05-USM-2014).

- **Secado y conservación.**

La raíz de *Waltheria ovata* Cav. fue secada bajo sombra y estabilizadas a una temperatura no mayor de 40 °C, posteriormente se trituró en partes pequeñas en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Humana de la UNMSM, hasta su utilización.

3.4.1.2. Obtención del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav.

El extracto etanólico se obtuvo por el método de maceración, para ello se pesó 1Kg de raíz trozada, el cual fue seguidamente macerado en etanol 96 % hasta agotamiento, durante 21 días,

una vez obtenido el extracto, se procedió a evaporar el solvente hasta sequedad completa del extracto con ayuda de una estufa a 40°C.

3.4.1.2. Screening fitoquímico preliminar del extracto etanólico.

Se procedió a hacer las reacciones de identificación o coloración para cada tipo de metabolito secundario presente, con los reactivos específicos; en los resultados se indicó la presencia o ausencia del metabolito: 5 mg de extracto problema con 5 gotas de reactivos.

3.4.2. Evaluación de la cuantificación de polifenoles totales presente en el extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por (García et al., 2012) Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración fue de 1-5 mg/L. El extracto de la muestra vegetal fue evaluado a una concentración de 0,1 mg/mL. A 100 µL de la muestra se le añadió 250 µL de la solución de Folin-Ciocalteu (diluido 1 en 2 con agua bidestilada), se sonicó por 5 min, luego se le añadió 1250 µL de carbonato de sodio al 20% y 400 µL de agua bidestilada. Se agitó vigorosamente, se cubrió de la luz y se le llevó a reposo por 90 minutos a temperatura ambiente. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm en un espectrofotómetro.

Las muestras fueron analizadas por triplicado y el contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado en mg de ácido gálico/g de extracto etanólico.

3.4.3. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro.

Ensayo del DPPH según (Brand-Williams *et al*, 1995) con modificaciones.

El método empleado fue con el ensayo de DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidracilo), expresado como IC₅₀ (µg de extracto etanólico /mL). Este valor corresponde a la concentración del extracto que reduce en un 50% la absorbancia de una solución metanólica de DPPH a 517 nm con una absorbancia inicial de 0,600. Se usó como estándar el reactivo TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 carboxilic acid).

La evaluación de la actividad antioxidante se expresó como porcentaje y se determina de acuerdo a la siguiente fórmula.

Dónde:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{(Am - Ab) 100}{A_{control}} \right\}$$

AA% = Porcentaje de actividad antioxidante

Am = Absorbancia de la muestra

Ab = Absorbancia del blanco

Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) según (Benzie & Strain, 1999).

El método se basa en la molécula TPTZ (2,4,6 tripyridyl-s-triazine) que actúa como un ligando estabilizador del Fe⁺². El ión férrico (Fe⁺³) en presencia de TPTZ fácilmente oxida a los antioxidantes y generándose el complejo reducido TPTZ – Fe⁺². La absorción se incrementa en presencia de antioxidantes.

Para este ensayo se utilizará:

Reactivo (A): Buffer Acetato 300 mM pH 3,6.

Reactivo (B): TPTZ (2,4,6 tripyridyl-s-triazine) 10 mM preparado en solución de HCl 40 mM.

Reactivo (C): Solución de FeCl₃ 20 mM.

Solución de trabajo FRAP: Se preparará en la proporción 10:1:1 (Reactivo A. Reactivo B: Reactivo C).

Solución Stock de FeSO₄ : 4 mM .

Solución Stock de TROLOX: 10 mM.

La actividad antioxidante será expresada como en términos de % de reducción equivalentes a Trolox.

La evaluación de la actividad antioxidante se expresó como porcentaje y se determina de acuerdo a la siguiente fórmula.

Dónde:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{(Am - Ab) 100}{A_{control}} \right\}$$

AA% = Porcentaje de actividad antioxidante
 Am = Absorbancia de la muestra con FRAP
 Ab = Absorbancia del blanco

Ensayo de captación del radical ABTS^{•+} según Pellegrini *et al.*, 2003.

La molécula ABTS: 2,2, – azinobis (3 – etilenbenzotiazolino-6 ácido sulfónico) es el sustrato para la formación del radical libre cationico ABTS^{•+} que se genera en reacción con el persulfato de potasio. Este radical en presencia de antioxidantes es reducido en función de la concentración del antioxidante y de la duración de la reacción, la magnitud de la reacción es determinada como % de inhibición del radical ABTS^{•+}

Para el ensayo se hicieron las diluciones previas de los extractos y reaccionaron con el ABTS por un tiempo de 10 minutos, registrándose la absorbancia a 734 nm a intervalos de 30 segundos.

La actividad antioxidante fue expresada como IC₅₀, y en términos de mg Equivalentes a Trolox (TEAC).

La evaluación de la captación del radical ABTS se expresó como porcentaje y se determina de acuerdo a la siguiente fórmula.

Dónde:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{(Am - Ab) 100}{A_{control}} \right\}$$

AA% = Porcentaje de actividad antioxidante
 Am = Absorbancia de la muestra con ABTS
 Ab = Absorbancia del blanco

3.4.4. Bioensayo de actividad antitumoral In vitro.

Obtención de las líneas celulares.

La línea celular humana DU-145 (adenocarcinoma de próstata) y línea celular de ratón: 3T3 (fibroblastos normales de ratón) fueron proporcionados por los laboratorios de investigación y desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (distrito de San Martín de Porres, Lima, Perú). El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular y Virología de Los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (LID-UPCH). La línea celular DU-145 fue cultivada y mantenida en crecimiento logarítmico en el medio de cultivo MEM (Minimum Essential Medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 50 µg/mL de gentamicina.

Finalmente la línea celular 3T3 creció en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco modified Eagle medium). Las líneas fueron mantenidas a una temperatura de 37 °C, en un ambiente húmedo, con 95% de aire y 5% de CO₂. Para resuspender cada línea celular, se lavó la monocapa de células con 3 x 4 mL de la solución de Hanks sin Ca-Mg.

Luego, se agregó 1 mL de la solución de tripsina-EDTA, que después de diez segundos se eliminó. Se incubó el frasco invertido, por ocho minutos a 37 °C, al término de los cuales los cultivos fueron resuspendidos en 2 mL de cada medio de cultivo. Luego, se contó las células usando un hemocitómetro. Cada pozo de una placa de 96 pozos recibió 160 µL de medio, conteniendo el número de células que se especifica en la tabla 1.

Tabla 1. Número y concentración de células por pozo.

Línea celular	Nº de células /pozo	N.º de células/38 mL
DU-145	3500	831 250
3T3	3000	712 500

Para el ensayo de citotoxicidad se utilizó una placa 0 (control), asignándose cuatro pozos para cada línea celular y una placa 1 (experimental) con doce pozos para cada línea celular. En cada pozo de ambas placas se colocó 160 µL de medio de cultivo conteniendo las células. Se incubó a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire, por 24 h. A la placa 0 se le añadirá ácido tricloroacético (TCA), para fijar las células y cuantificarlas luego, en tiempo cero. A la placa 1 se le agregó las diferentes diluciones de los extractos y de 5-fluorouracilo, que se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Diluciones del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. y 5-fluorouracilo.

Diluciones	<i>Waltheria ovata</i> Cav.	Control positivo
	Raíces (ug/mL)	5-FU* (ug/mL)
1	250	15,63
2	125	3,91
3	62,5	0,98
4	31,25	0,24

* 5-Fluorouracilo

Para las diluciones de extracto, se mezcló 5 mg de extracto + 20 mL de etanol al 100% y será centrifugado a 12 000 RPM, por diez minutos. El sobrenadante será el stock de 5 mg/20 mL y de este 8,5 mL serán diluidos en 340 mL de medio; con diluciones sucesivas de 1:4. La concentración inicial que se usó fue 2,5 µg/mL para el 5-fluorouracilo y 250 µg/mL para el extracto. Luego, la placa 1 fue incubada por 48 horas adicionales.

Evaluación de la actividad antitumoral, según el Método del Bioensayo de citotoxicidad con Sulforodamina B (SRB) (Skehan *et al.*, 1990). Al ensayo se añadió ácido tricloroacético (TCA) a las placas con los cultivos celulares de cáncer de próstata. Las células que se fijaron con el TCA, se teñieron por 20 minutos con una solución de SRB al 0,4% en ácido acético al 1%. El SRB no unido a proteínas se removió con un lavado de ácido acético al 1%. Luego de secar las placas, el SRB unido a las proteínas se solubilizó con una solución 10 mM de Tris base (Tris (hydroximetil) aminometano) (pH 10,5), luego fue leído en una lectora de microplacas a 450 nm.

3.4.5. Evaluación de la seguridad del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Toxicidad oral a dosis repetidas durante 28 días (OECD, 1995).

El procedimiento se realizó según lo estipulado en el ensayo 407 de las directrices de la OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Se utilizó 20 ratas Holtzmann (10 de cada sexo), con un peso promedio de 250 g; los animales fueron sometidos a un período de aclimatación de 5 días. El día antes del inicio del ensayo se conformaron los 2 grupos experimentales de 10 animales (5 de cada sexo). Un grupo fue control (I), al cual se le administró vehículo (agua destilada) y el otro fue grupo tratado (II) al cual se le administró extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav., en dosis de 2000 mg/kg una vez/día vía oral durante 28 días, según el siguiente diseño:

Grupo control (I): 5 machos y 5 hembras → agua destilada

Grupo tratado (II): 5 machos y 5 hembras → ext. Etanólico de raíz 2000 mg/kg vo 1 v/d durante 28 días.

Toxicidad oral a dosis única durante 14 días (OECD, 1995).

Debido a la posible inocuidad de la sustancia de ensayo se procedió a realizar el ensayo límite regulado por la OECD en su norma N° 423 (OECD Guideline For Testing Of Chemical “Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method” N° 423, 1996).

En la determinación de la toxicidad aguda del extracto se emplearon ratones cepa Balb/C de aproximadamente 8 semanas post destete, masa corporal entre 25 y 30 g procedentes de la bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS) los cuales fueron mantenidos en una habitación a temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ \text{C}$ y humedad de 55-70 %, ciclo luz /oscuridad de 12-12 h. La alimentación consistió en ración palletizada (proveniente del Centro de Producción de la Universidad Agraria La Molina) y agua a voluntad.

Se confeccionaron 2 grupos de 3 animales de ambos sexos. Todos fueron identificados para la dosificación exacta de acuerdo a su peso corporal.

La sustancia se administró a una dosis de 2 000 mg/kg para lo cual se pesaron 2,5 g del extracto que se suspendieron en 25 mL de agua destilada. Dieciséis horas antes de la administración de la sustancia se les retiró la comida a todos los animales y esta se realizó por vía oral mediante cánula intragástrica.

3.4.6. Tratamiento estadístico

Para el análisis de la actividad antitumoral in vitro se creó una base de datos en el paquete Microsoft Excel 2010. La concentración inhibitoria 50 (CI50) se halló mediante el análisis de regresión lineal (ecuación de la recta: $y=mx+b$). Luego, se precisará el índice de selectividad de los extractos, definido como la relación de citotoxicidad entre células normales y células cancerosas: $\text{CI50 (línea celular 3T3)} / \text{CI50 (línea tumoral)}$, el cual es >1 cuando la citotoxicidad para las células tumorales supera a la citotoxicidad en las células normales.

Finalmente, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (r), que nos indicaron la relación dosis-respuesta entre las concentraciones y el porcentaje de crecimiento. Se considerará un $p < 0,05$ como significativo. Los análisis de los resultados de la toxicidad, capacidad antioxidante in vitro e in vivo fueron presentados en cuadros estadísticos descriptivos como la media, desviación estándar, intervalo de confianza, mínimo y máximo. Así como un análisis de ji cuadrado para asociar las variables cualitativas en el estudio de toxicidad y el método de los Probits. Se utilizará el programa SPSS versión 19.

3.4.7. Consideraciones éticas

Se tomó en cuenta los siguientes tópicos para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, (**Institute for Laboratory Animal Research, 2010**), y en respeto a nuestra normativa vigente de la Ley de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio (Ley N° 27265):

La especie y número de animales requeridos son justificados. Se dispuso del uso de procedimientos menos invasivos.

Las instalaciones utilizadas para el alojamiento de los animales facilitó el bienestar del animal y las necesidades de la investigación (espacio adecuado, cerrado, adecuada ventilación e iluminación, limpieza y cambio de viruta, entre otros).

El alimento y el agua se proporcionaron ad libitum.

Se evitó la duplicación innecesaria de experimentos.

Criterio y procedimiento para la programación de intervención, remoción de animales del estudio, o eutanasia si se anticipa dolor o estrés y al finalizar etapa experimental. En este caso se empleará un adecuado método de eutanasia con pentobarbital sódico a dosis de 100mg/kg según Normas internacionales del cuidado de animales de experimentación (**American Veterinary Medical Association, 2007**).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. TAXONOMÍA, PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Waltheria ovata* Cav. Y SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR.

- **UBICACION TAXONOMICA DEL LUCRACO**

La posición botánica, según la Dirección del Museo de Historia Natural de la U.N.M.S.M. Es la siguiente:

División: MAGNOLIOPHYTA

Clase: MAGNOLIOPSIDA

Subclase: DILLENIIDAE

Orden: MALVALES

Familia: STERCULIACEAE

Género: *Waltheria*

Especie: *Waltheria ovata* Cav.

Nombre vulgar: Lucraco

- **DE LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO**

El porcentaje de rendimiento del extracto etanólico seco (%EES) fue de 62 %. Este resultado fue obtenido con la siguiente expresión:

$$\%EES = \frac{\text{Peso final del extracto seco}}{\text{Peso inicial de la muestra seca}} \times 100$$

4.1.2. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO PRELIMINAR DEL EXTRACTO ETANÓLICO.

Los resultados del análisis fitoquímico cualitativo se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Prueba preliminar cualitativa de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. “lucraco”.

Prueba de caracterización	Resultado	Metabolito secundario
Reacción de la NINHIDRINA	(+)	Grupos aminos libres
Reacción de la GELATINA	(-)	Taninos
Reacción con CLORURO FÉRICO (FeCl_3)	(+)	Compuestos Fenólicos
Reacción de DRAGENDÖRFF	(-)	Alcaloides
Reacción MAYER	(-)	Alcaloides
Reacción de SHINODA	(+)	Flavonoides
Reacción de BORNTRAGER	(+)	Quinonas
Reacción de LIEBERMAN-BURCHARD	(+)	Triterpeno y/o esteroides
Prueba de la ESPUMA	(+)	Saponinas

(-) = Ausencia; (+) = Presencia

4.1.3. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES PRESENTES EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE RAÍZ DE *Waltheria ovata* Cav.

El contenido de polifenoles totales presentes en el extracto etanólico de *Waltheria ovata* Cav. se expresan en mg equivalentes al ácido gálico (mgEAG/g).

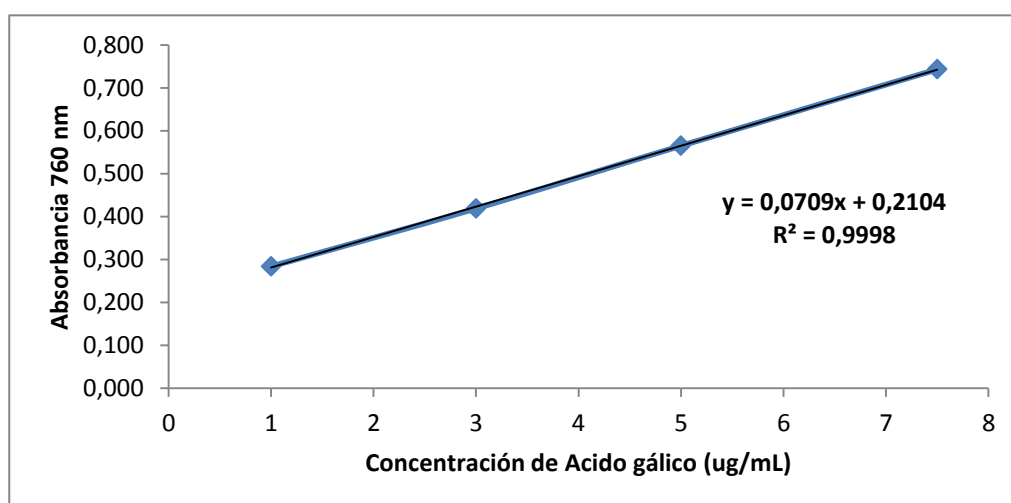


Figura 24. Curva de calibración del ácido gálico

Tabla 4. Cuantificación de polifenoles totales del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Muestra	mgEAG/g extracto	D.E.
Extracto etanólico de raíz de <i>Waltheria ovata</i> Cav. "lucraco"	2250	23

D.E.: desviación estándar

4.1.4. EFECTO ANTIOXIDANTE IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAIZ DE *Waltheria ovata* Cav. “lucraco”

Tabla 5. Determinación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical 1,1 difenil-2-picri-hidrazil (DPPH) del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Sustancia ensayada	Concentración ug/mL	Porcentaje de inhibición (%)	Cl ₅₀ ± DE (ug/mL)
Trolox	0,1	21,57	0,89 ± 0,04
	0,5	40,72	
	1	66,93	
	2	99,14	
Vitamina C	0,1	7,54	1,90 ± 0,04
	0,5	13,45	
	1	27,53	
	2	51,63	
<i>Waltheria ovata</i>	3	96,58	0,48 ± 0,02
	0,1	23,21	
	0,5	52,85	
	1	70,04	
	2	98,96	
	3	99,56	

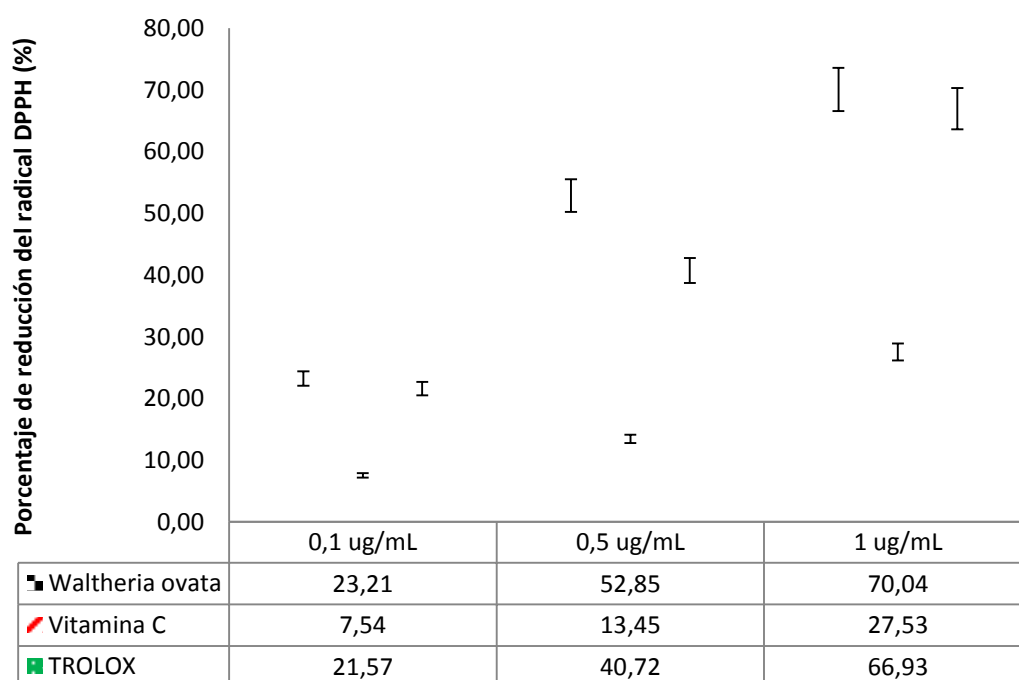


Figura 25. Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Tabla 6. Determinación de la actividad antioxidante mediante Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Sustancia ensayada	Concentración ug/mL	Porcentaje de reducción (%)	Cl ₅₀ ± DE (ug/mL)
Trolox	0,1	15,46	0,75 ± 0,02
	0,5	44,89	
	1	66,12	
	2	99,14	
Vitamina C	0,1	5,06	1,38 ± 0,07
	0,5	22,09	
	1	46,85	
	2	71,23	
<i>Waltheria ovata</i>	3	91,36	0,41 ± 0,08
	0,1	32,01	
	0,5	56,12	
	1	88,00	
	2	98,01	
	3	99,65	

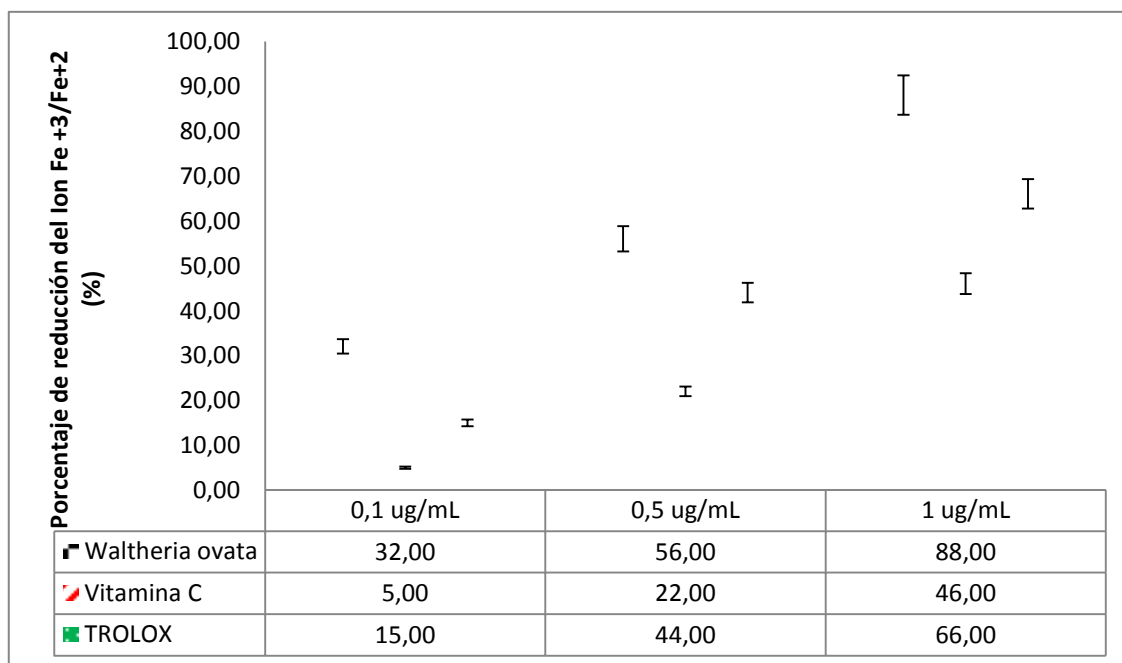


Figura 26. Comparación de la actividad antioxidante mediante la reducción del ión Férrico Fe⁺³ a Ferroso Fe⁺² del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Tabla 7. Determinación de la actividad antioxidante mediante Ensayo de Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav.

Sustancia ensayada	Concentración ug/mL	Porcentaje de inhibición (%)	TEAC/ g de extracto)
Trolox	0,1	23,69	1,48 ± 0,02
	0,5	46,25	
	1	68,98	
	2	96,36	
Vitamina C	0,1	32,89	
	0,5	56,89	
	1	87,56	
	2	91,05	
<i>Waltheria ovata</i>	3	96,88	
	0,1	31,12	
	0,5	66,69	
	1	96,36	
	2	99,98	
	3	99,56	

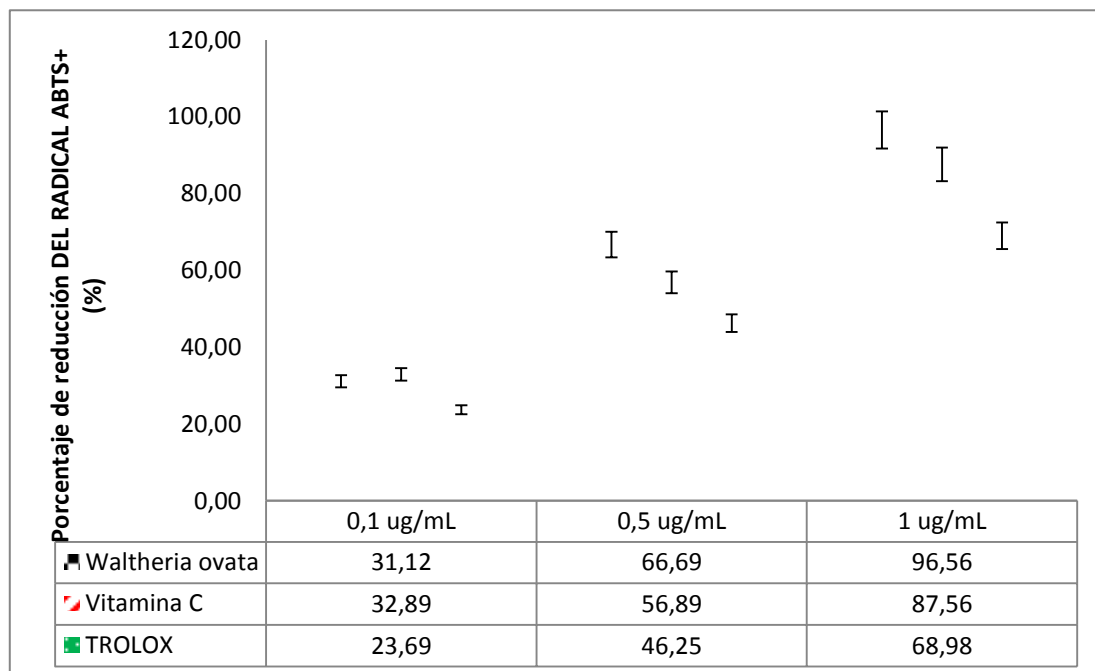


Figura 27. Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS+ del extracto etanólico de raíz de *Waltheria ovata* Cav

4.1.5. EFECTO ANTITUMORAL SOBRE LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PROSTATA DU-145 DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAIZ DE *Waltheria ovata* Cav.

Tabla 8. Valores de GI 50 y citotoxicidad del extracto etanólico de *Waltheria ovata*. y 5- Fluoro-Uracilo en célula tumoral y normal.

Sustancias citotóxicas	Valores de GI 50 (ug/mL) †		*p valor
	Célula tumoral humana DU-145	Célula normal de ratón 3T3	
<i>Waltheria ovata</i>	> 250	60,55 ± 2,14	p<0,001
Control	-	-	
5-FU*	0,93 ± 0,05	< 0,24	p<0,001

Valores expresados en promedio y desviación estándar de tres mediciones. † Concentración Inhibitoria 50, * 5-Fluoro-Uracilo.* Coeficiente de correlación de Rho de Spearman.

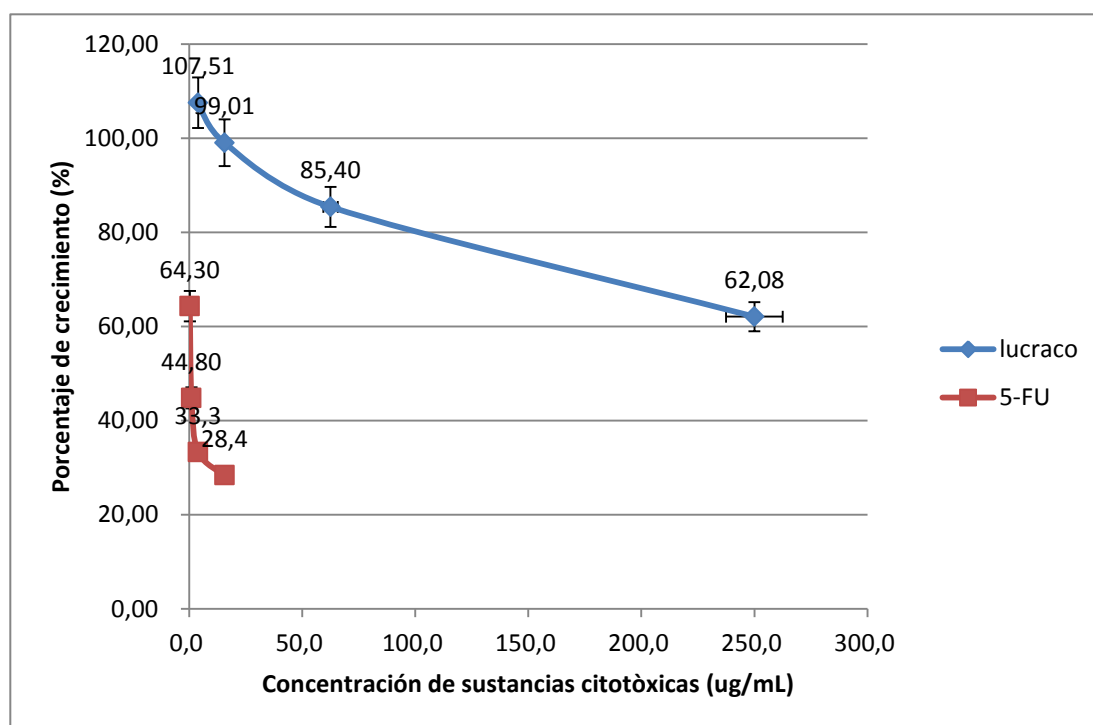


Figura 28. Comparación del efecto antitumoral de las sustancias citotóxicas sobre la línea celular tumoral DU-145 (adenocarcinoma de próstata)

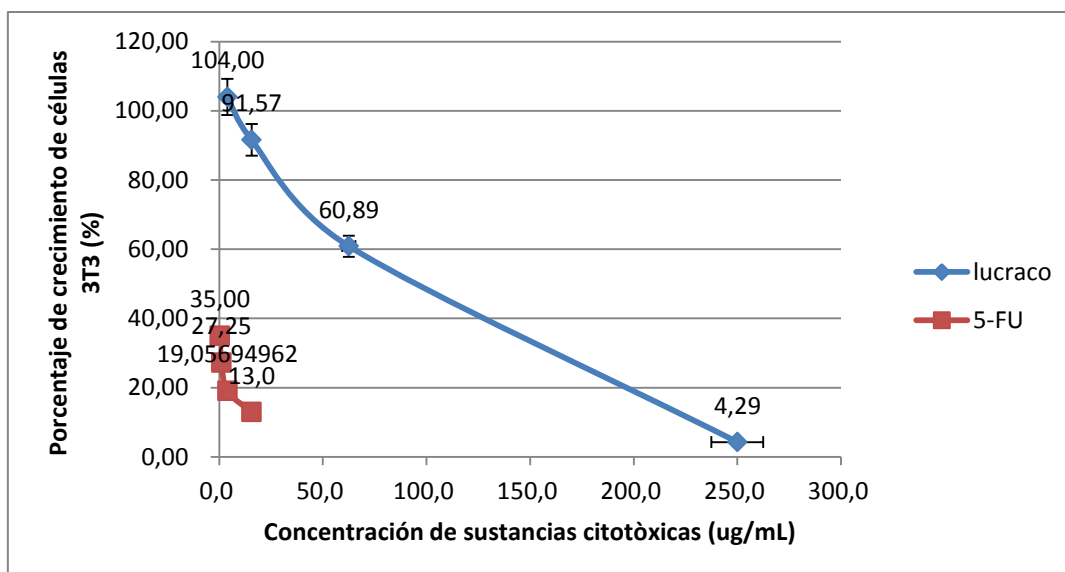


Figura 29. Comparación del efecto antitumoral de las sustancias citotóxicas sobre la línea celular fibroblastos normales de ratón 3T3

4.1.6. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD A NIVEL PRECLÍNICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAIZ DE *Waltheria ovata* Cav.

Tabla 9. Parámetros bioquímicos hematológicos de las ratas sometidas a tratamiento con el E.E. de *Waltheria ovata* durante 28 días.

Tratamiento	Hemoglobina (g/dL)	Hematocrito (%)	Leucocitos	Colesterol total (mg/dL)	HDL-Colesterol (mg/dL)
Control	12,34 ± 0,07	38,14 ± 0,02	9167,25 ± 51,51	177,27 ± 8,66	53,48 ± 2,26
Extracto 100 mg/Kg	12,30 ± 0,16	38,49 ± 0,04	8175,34 ± 53,37	157,66 ± 8,21	52,24 ± 1,57
Extracto 200 mg/Kg	12,47 ± 0,10	38,94 ± 0,16	7807,36 ± 110,45	157,08 ± 12,54	49,69 ± 1,02

En la evaluación de la toxicidad oral aguda en ratones albinos Balb-C 53, a dosis de 2000 mg /Kg a dosis única, no se observaron signos tóxicos clínicamente relevantes ni muertes durante 14 días de observación.

En la tabla 9 y 10 se observan los parámetros bioquímicos evaluados en el ensayo de toxicidad subaguda a las ratas raza Holtzman de ambos sexos durante 28 días en dosis repetidas del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* a dosis de 100 y 200 mg/Kg.

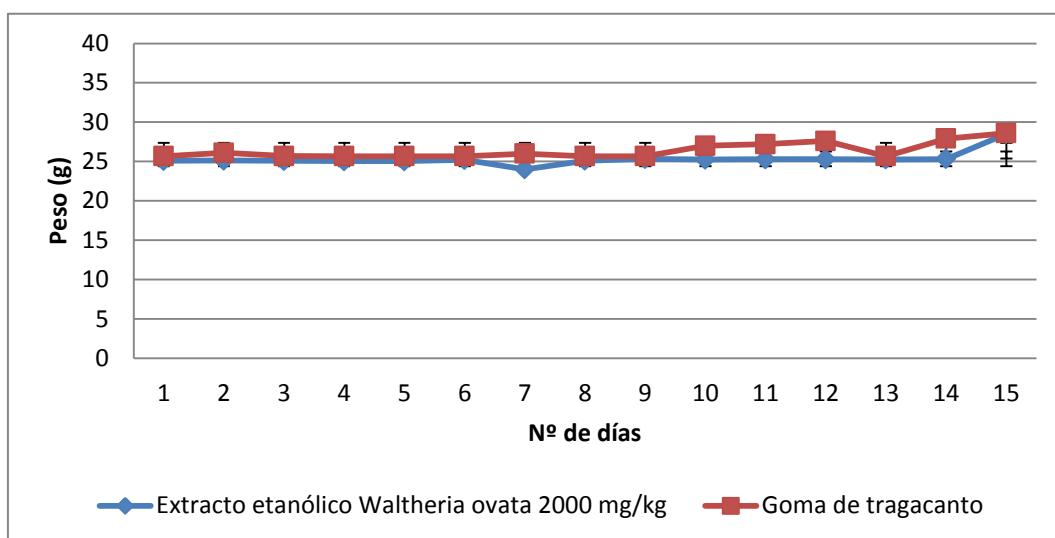


Figura 30. Evaluación del peso de los ratones en el estudio de la toxicidad oral aguda durante 14 días

4.2. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal: Determinar el efecto antioxidante y antitumoral *in vitro* del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco" sobre la línea celular de cáncer de próstata DU-145. Es necesario mencionar que el aporte científico que se ha obtenido como resultado del presente estudio dará a la población mayor seguridad en el uso de esta especie vegetal como medicina tradicional o folklórica y así mismo queda abierta la posibilidad para la industria de las plantas medicinales de establecer su composición química y elaborar una presentación farmacéutica que garantice su uso terapéutico, así como la continuación del efecto antitumoral en el cáncer de próstata con estudios *in vivo*.

En el estudio fitoquímico preliminar se ha identificado la presencia de metabolitos secundarios (ver tabla 03), tales como grupos aminos libres, compuestos fenólicos y flavonoides principalmente. No se evidenció la presencia de alcaloides en comparación a las otras especies de *waltherias* según lo reportado por Zongo et al., (2013), que demostró la presencia de alcaloides en la especie *Waltheria indica*, entre otras donde los alcaloides son al parecer el marcador fitoquímico de esta especie. El no determinar la presencia de alcaloides demuestra que las propiedades medicinales de *Waltheria ovata* Cav. que se desarrolla en el ecosistema de la ciudad de Ica se atribuyen a otros tipos de metabolitos secundarios de naturaleza no alcaloidal.

La complejidad estructural de los polifenoles varía desde simples moléculas fenólicas (como el ácido gálico) hasta complejos altamente polimerizados, como son los taninos. En nuestro estudio determinamos el contenido de polifenoles totales (2250 ± 23 mgEA/g extracto), y que los resultados obtenidos, superan a especies nativas reconocidas como la tara y el camu camu ($29,5 \pm 0,11$; $11,7 \pm 0,05$ mgEAG/g extracto), respectivamente, así como la *Uncaria tomentosa* (uña de gato), *Zea mays* (maíz morado), *Smallanthus sonchifolius* (yacón), *Lepidium meyenii* (maca),

Krameria triandra (ratania) y *Physallis peruviana* (aguaymanto) según lo reportado por Doroteo et al., (2012).

Entre todas las propiedades biológicas atribuidas a los flavonoides la de mayor interés ha sido su actividad antioxidante. El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen un gran número de métodos para la determinación de extractos con actividad antioxidante. En la determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de *Waltheria ovata* y del trolox así como la vitamina C, utilizados como patrón de comparación se observa que la diferencia es significativamente alta en los tres métodos de evaluación: DPPH (figura 25), FRAP (figura 26) y ABTS (figura 27), siendo el extracto más activo que el control a concentraciones bajas, estableciendo un efecto concentración dependiente del extracto.

La actividad antioxidante del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. se debe, en parte, a la presencia y gran cantidad de compuestos fenólicos presentes en su composición fitoquímica. Se ha documentado ampliamente que la presencia de estos metabolitos se asocia con la actividad antioxidante de una amplia variedad de frutos y otras especies (Céspedes et al., 2000; Lonkar, et al., 2011; Tan et al., 2013). La actividad antioxidante de sus polifenoles se asocia con sus características estructurales. Las estructuras que poseen grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B y OH en C-3 e insaturación del anillo C, permiten estructuras mesoméricas estables con capacidad eficiente de captura de radicales libres, requisito para una máxima capacidad antioxidante (Dahlawi et al., 2012).

Es conocido que el estrés oxidativo no solo induce daños celulares a través del daño a proteínas, lípidos y ADN. También puede alterar vías de señales sensibles a cambios redox implicadas en la respuesta de la apoptosis. En este sentido, las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden ser los desencadenantes del proceso apoptótico (Díaz & Salirrosas, 2012).

En los últimos años han sido descritas numerosas propiedades de estos compuestos, como la posibilidad de inhibir el ciclo celular, la proliferación

celular y el estrés oxidativo, y de inducir la detoxificación de enzimas, la apoptosis, y de estimular el sistema inmune (Del Rio et al., 2009). Las actividades antioxidante y anticarcinogénica de los polifenoles de la dieta han sido ampliamente estudiadas en diferentes líneas celulares y en animales de experimentación. Además, diversos estudios epidemiológicos han mostrado una asociación entre el consumo de alimentos y bebidas ricos en polifenoles y la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer.

Basándose en la Guía del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (Dahlawi, H., et al., 2012), un extracto crudo es considerado que tiene actividad citotóxica in vitro si el valor de GI50 sobre las células tumorales, siguiendo una incubación entre 48 y 72 horas, es ≤ 20 ug/mL, mientras que para un compuesto puro el valor de GI50, es ≤ 4 ug/mL. El extracto obtenido de la raíz no mostró actividad citotóxica (ver Tabla 08) frente a la línea celular DU-145, (GI50 > 250 ug/mL), sin llegar a superar al 5-Fluro-uracilo (compuesto puro). Sin embargo, la citotoxicidad fue menor para las línea control 3T3 (GI50 = $60,55 \pm 2,14$).

Se ha reportado que extracto etanólico de *Waltheria indica* es citotóxico (IC50 = $18,63 \pm 5,03$ µg/ml) para la línea tumoral carcinoma laríngeo (Hep-2), *Waltheria lanceolata* (IC50 = $64,94 \pm 5,78$; $62,66 \pm 16,28$; $25,60 \pm 14,67$) en las líneas celulares tumorales CL 6 (cholangiocarcinoma), HepG2 (hepatocarcinoma), Hep-2 (carcinoma laríngeo) respectivamente (Vauzour et al., 2010), se plantea que el extracto etanólico de la raíz de lucraco no presenta tal actividad por la ausencia de otros metabolitos como es el caso de los alcaloides, puesto que en estudios anteriores de otras especies de *Waltheria*, la actividad citotóxica le atribuían a los alcaloides como las Whalterionas siendo el componente activo de *Waltheria indica*, que mostró actividad citotóxica sobre la línea celular tumoral MCF-7 (adenocarcinoma de mama) con un IC50 igual a $35,72$ µM (Vauzour et al., 2010)

La poca actividad sobre las células de cancer de próstata (DU-145), independiente de hormona, se debería también a la gran cantidad de polifenoles presentes que actuarían como agentes protectores de las células

tumorales, interrumpiendo el rol prooxidante (Weng et al, 2012). En otros estudio con cultivos celulares de cáncer de próstata (CP), realizado con flavonoides aislados como la Genisteína (1 μ M/mL y 100 ng/mL, respectivamente), demostró que esta era citotóxica sobre la línea celular de cáncer de próstata (CP) MAT-lylu y sobre la línea de CP humano PC-3. Sin embargo, la adición de genisteína a concentraciones entre 0,07 y 0,285 mg/kg/día no inhibió el crecimiento de células MAT-lylu implantadas en ratas (Henderson et al., 2009).

El resveratrol, otro polifenol presente en el vino tinto, parece inhibir el crecimiento del cáncer de próstata (CP), alterando la mitogénesis. Se ha reportado una inhibición significativa en la proliferación de las células tumorales LNCaP al cuarto día de la incubación cuando se añade una concentración de 2.5×10^{-6} M de resveratrol al medio de cultivo. Para producir ese mismo efecto sobre las líneas celulares DU-145 y PC-3, se necesita una concentración diez veces mayor ($2,5 \times 10^{-5}$ M) (Diaz, et al., 2012).

En la actualidad, existe una gran controversia respecto a los antioxidantes y su uso frente al cáncer. Muchos de los fármacos que se administran durante la quimioterapia inducen estrés oxidativo en las células cancerígenas, lo que conduce a su destrucción por necrosis y/o apoptosis, por lo que la administración de antioxidantes, como los compuestos fenólicos de la dieta, podría disminuir esa alteración del estado redox celular e impedir la muerte de las células cancerígenas (Moiseeva, 2007). Esta observación se ha puesto de manifiesto recientemente al demostrarse que el compuesto del té verde EGCG interfiere con los efectos anticancerígenos de Bortezomib, un fármaco usado para el tratamiento del mieloma y linfoma, dado que bloquea su función inhibidora del proteosoma. Sin embargo, otros estudios han demostrado que los compuestos fenólicos también pueden contribuir a la inducción de la muerte de las células cancerígenas a través de un efecto pro-oxidante. En este sentido, se ha descrito que la genisteína actúa de manera sinérgica con el 5-fluorouracilo potenciando la muerte de las células de cáncer de colon inducida mediante el incremento de la generación de las ERO intracelulares (Aydin et al., 2006). De hecho, el empleo de los

compuestos fenólicos parece incrementar la eficacia de los fármacos anticancerígenos, lo que permite reducir su dosis. De esta manera, un estudio reciente ha mostrado que la quercetina disminuye el contenido de GSH intracelular y potencia la acción apoptótica del trióxido de arsénico (As_2O_3), fármaco que se utiliza frente a la leucemia (Agbor et al., 2006).

La quercetina parece tener actividad anticancerígena, y ello se ha relacionado con su actividad antioxidante, su capacidad para inhibir enzimas que activan carcinógenos, y con su actividad para modular diferentes rutas de transducción de señales. De manera más concreta, se han demostrado que un tratamiento a corto plazo con quercetina tiene un efecto antioxidante y antiapoptótico, mientras que un tratamiento a largo plazo resulta en una acción pro-oxidante y pro-apoptótica. Además, se ha descrito que los efectos de la quercetina sobre la apoptosis dependen en gran medida de las condiciones experimentales, como por ejemplo, su concentración en el medio y el tipo celular sobre el que actúa (Hanahan & Weinberg, 2012). Es por ellos que en el estudio quercetina disminuye la viabilidad de las células HepG2 de manera dosis- y tiempo-dependiente. En este sentido, otros estudios han demostrado que las concentraciones bajas de quercetina evocan mecanismos de protección, supervivencia y/o proliferación, mientras que las concentraciones altas de este flavonoide tienen un efecto apoptótico y necrótico. Así, la quercetina estimula el crecimiento de la línea de carcinoma escamoso SCC-25 si se administra en concentraciones de 1 a 10 $\mu\text{mol/L}$, mientras que dosis más altas (100 $\mu\text{mol/L}$) lo inhiben (Van-Poppel & Tombal, 2011).

En este sentido, algunos estudios han descrito que diversos compuestos fenólicos a bajas concentraciones tienen un efecto antioxidante y antiapoptótico y promueven la proliferación celular. Por el contrario, parece que los compuestos fenólicos a altas concentraciones actúan como agentes pro-oxidantes y parecen inducir apoptosis de manera selectiva en las células cancerígenas. Sin embargo, el mecanismo molecular de acción de cada uno de estos compuestos fenólicos ligado a un efecto determinado aún no está bien caracterizado.

En el ensayo de toxicidad oral, el extracto etanólico de la raíz de lucraco administrado en ratones no evidenció muertes durante los 14 días de evaluación a ningún nivel de dosis, según el protocolo empleado y tampoco se observó daño a órganos y variación significativa del peso corporal (ver figura 30), por lo que nuestros resultados se ajustan a lo reportado por Gressler et al.,(2008), y se relaciona con el estudio de citotoxicidad in vitro a los fibroblastos normales de ratón 3T3 donde se demuestra que no presenta citotoxicidad para estas células. En el ensayo de toxicidad oral aguda a dosis repetida por 28 días no se evidenció signos clínicos de toxicidad a nivel bioquímico y hematológico (ver tabla 09).

Es necesario realizar más estudios a nivel químico y farmacológico del extracto etanolico de *Waltheria ovata* Cav. por la buena actividad antioxidante que se demostró superando a otras especie vegetales muy populares que se desarrolla en nuestro país y por ser una especie promisoría en las diferentes patologías.

CONCLUSIONES

- Se ha demostrado que el extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. “lucraco” contiene compuestos fenólicos, grupos aminos libres, flavonoides, quinonas.
- Se ha determinado que el extracto etanólico de *Waltheria ovata* posee gran cantidad de compuestos fenólicos con un valor de 2250 mgEAG/g extracto.
- En las condiciones experimentales, se ha comprobado que el extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. “lucraco” presenta efecto antioxidante in vitro al requerir concentraciones muy bajas para reducir el radical DPPH, FRAP y ABTS⁺.
- Se ha demostrado que el extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. “lucraco” no presenta citotoxicidad in vitro sobre la línea celular tumoral humana DU-145) adenocarcinoma de próstata y células normales de ratón (3T3).
- Se ha verificado que el extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. “lucraco” no presenta signos tóxicos ni muertes en ratones hasta 14 días al administrarlo en dosis única de 2000 mg/Kg; asimismo no es tóxico en ratas a dosis repetidas por 28 días a 100 y 200 mg /Kg.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agarwal, Ch., Singh, R.P., Agarwal R. (2002). Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Carcinogenesis*. 23(11):1869–1876.
2. Agbor, G.; Vinson, J.; Oben, J.; Ngogang, J. (2006). Comparative analysis of the in vitro antioxidant activity of white and black pepper. *Nutr. Res.* 26, 659–663.
3. Alimirah, F., Chen, J., Basrawala, Z., Xin, H, Choubey, D. (2006). DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Letters*. 580 (9): 2294-2300, DOI: 10.1016/j.febslet.2006.03.041)
4. American Veterinary Medical Association (AVMA). 2007. Guidelines on euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia). Washington DC. EUA.
5. Aydin, A., Arsova-Saradinovska, Z., Sayal, A., Eken, A., Erdem, O., Erten, K., *et al.*, (2006). Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clin Biochem*. 39: 176-179.
6. Benítez D. (2006) Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed*. 25(2).
7. Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70–6.
8. Bumber Y, Issa JP. (2011). Epigenetics in cancer: what’s the future? *Oncology*. 25:220–6, 228.
9. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28 (1): 25 -30.

10. Castro, W., De Souza, J.R., Menezes, H.E., Heinzen, H., Cesio, M.V., Mato, M, et al. (2009) Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*; 164: 267–274
11. Céspedes T, Sánchez D. (2000). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev. Cubana Cardiología*. 14(1):55-60.
12. Cragg, G.M., Newman, D.J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 100: 62–79.
13. Craig, W. J. (2009). Health effects of vegan diets. *American Journal of Clinical Nutrition*. 89 (5):1627S–1633S.
14. Dahlawi H, Jordan-Mahy N, Clench MR, Le Maitre CL. (2012) Shares bioactive extracts of pomegranate fruit in leukemia cell lines in vitro are promising for new therapeutic agents for leukemia. *Nutr Cancer*; 64:100-10.
15. Davies, B.J., Smaldone, M.C., Sadetsky, N., Dall’era, M., Carroll, R. (2009). The impact of obesity on overall and cancer specific survival in men with prostate cancer. *Journal of Urology*. 182 (1): 112–117.
16. De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C.G., et al. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*; 7:256-69.
17. De Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattas CR. (2004). “*Melissa officinalis* L. Essential oil: antitumoral and antioxidant activities,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (9): 2485–2489.
18. De Souza MM, De Jesus RA, Cechinel-Filho V, Schlemper V. (1998). Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomed*. 5(2):103-107.
19. Del Rio, D., Valtuena, S., Pellegrini, N., Bianchi, M. A., Ardigo’, D., Franzini, L., et al. (2009). Intervention study with a high or low antioxidant capacity diet: effects on circulating b-carotene. *European Journal of Clinical Nutrition*, 5, 63–1220.

20. Diaz L E, Muñoz D R, Prieto R E, Cuervo S A, Gonzalez D L. Guzman J D, et al. (2012). Antioxidant, Antitubercular and Cytotoxic Activities of Piper imperiale. *Molecules*. 17, 4142-4157; doi: 10.3390/molecules17044142.
21. Diaz, S., Salirrosas, M. (2012). Cáncer de próstata metastásico asociado a valores bajos de antígeno prostático específico. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 29(4):571-4.
22. Doroteo V.H., Díaz C., Terry C. (2013). Rosario Rojas. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Rev Soc Quím Perú*. 79 (1):13-20.
23. Doroteo VH, Terry C, Díaz C, Vaisberg A, Rojas R. (2012). Compuestos fenólicos y actividades antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y fotoprotectora in vitro de Myrciaria dubia (camu camu) y Caesalpinia spinosa (tara). *Rev Soc Quím Perú*. 78 (4):263-264.
24. Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2008). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, 80(4), 1290–1296.
25. Ferlay, J., Shin, H., Bray. F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M. (2010). Globocan 2008. V2.0, Cancer incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base N° 10 (Internet). International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.
26. Green R.C. (2007). Physicochemical properties and phenolics composition of selected Saskatchewan fruits: buffaloberry, chokecherry and sea buckthorn. [Tesis Doctoral]. Universidad Saskatchewan. 41-49.
27. Gressler, V., Stüker, C., Dias, G., Dalcol, I., Burrow, R., Schmidt, J., et al. (2008). Quinolone alkaloids from *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry*. 69: 994-999.
28. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646–74.
29. Hari C, Ramesh A, Krishna G. (2013) Hepatoprotective and antioxidant effect of Ecbolium viride (Forssk.) Alston roots against

- paracetamol-induced hepatotoxicity in Albino Wistar rats. *Journal of pharmacy research* 7. 496-501.
30. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
 31. Henderson, K., Stella, S.L., Kobylewski, S., Eckhert, C.D. (2009). Receptor activated Ca (2+) release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells, *PLoS One* 4. e6009.
 32. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), Departamento de Epidemiología y Estadística del Cáncer. (2011). Informe Ejecutivo: Registro de Cáncer de Lima Metropolitana 2004-2005. Lima, Perú.
 33. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., *et al.* (2008). Cancer Statistics 2008. *CA Cancer J Clin.* 58:71-96.
 34. Jiang, Z. Y., Jiang, S. Q., Lin, Y. C., Ma, X. Y., Xi, P. B., Cao, T., *et al.* (2008). Effect of genistein on antioxidative defence system and membrane fluidity in chick skeletal muscle cells. *Asian–Australasian Journal of Animal Sciences*, 21, 1220–1225.
 35. Kerry, N., & Abbey, M. (1998). The isoflavone genistein inhibits copper and peroxy radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 140, 341–347.
 36. Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P., Koul, H.K. (2008). Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett.* 282:125-36.
 37. Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology Appl Pharmacol.* 254:86-99.
 38. Kristiansen, G. (2012). Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. *Histopathology.* 60, 125–141. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.04083.x.
 39. Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 711:193-201.

40. Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3:21-33.
41. Lock de Ugaz O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2da ed. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. p.1-7.
42. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. (2008). Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Proliferation*. 41(6): 1002–1012.
43. Lonkar, P., Dedon, P.C. (2011). Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer*; 128:1999-2009.
44. Lu, N., Chen, W., & Peng, Y. Y. (2011). Effects of glutathione, trolox and desferrioxamine on hemoglobin-induced protein oxidative damage: Antioxidant or pro-oxidant? *European Journal of Pharmacology*, 659, 95–101.
45. Madhu P, Vijaya A, Ganga B. (2002) Investigation of hepatoprotective activity of *Cyathea gigantea* (Wall. ex. Hook.) leaves against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (5):352–356.
46. Martinez ME. (2005). Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results Cancer Res*. 166:177-211.
47. Martínez-Florez, S, González-Gallego, J, Culebras, J, Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17(6):271-78.
48. Mishra P, Sinha S, Guru S, Bhushan S, Vishwakarma R. Ghosal, S. (2011). Two new amides with cytotoxic activity from the fruits of *Piper longum*. *J. Asian Nat. Prod. Res*. 13, 143–148.
49. Moiseeva, E.P., Almeida, G.M., Jones, G.D., Manson, M. (2007) Extended treatment with physiologic concentrations of dietary phytochemicals results in altered gene expression, reduced

- growth, and apoptosis of cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 6 (11):3071–3079.
50. Morel, A.F., Flach, A., Zanatta, N., Ethur, E.M., Mostardeiro, M.A., Gehrke, T.S. (1999). A new cyclopeptide alkaloid from the bark of *Waltheria douradinha*. *Tetrahedron Lett.* 40, 9205–9209.
 51. Naz T, Mosaddik A, M Rahman, Muhammad I, Haque E, Cho SK. (2012). Compuestos antimicrobianos, antileishmanial y citotóxicos de Piper chava. 26 (11):979-86.
 52. OECD. 1995. Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Nº 47 [series in Internet]. [Cited 15 Oct 2012]. Accessed in: <http://www.oecd.org>
 53. Palozza, P., Simone, R., Picci, N., Buzzoni, L., Ciliberti, N., Natangelo, A., Manfredini, S. Vertuani, S. (2008). *Free Radic. Bio. Med.* 44, 1452.
 54. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* 133: 2812–9..
 55. Pérez, T. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas.* 22(1):48-57.
 56. Poljšak, B., Gazdag, Z., Pesti, M., Jenko-Brinovec, S., Belagyi, J., Plesnic̆ar, S., et al. (2006). Pro-oxidative versus antioxidative reactions between trolox and Cr(VI): The role of H₂O₂. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22, 15–19.
 57. Pow-Sang, M., Huamán, M.A. (2013). Retos para el diagnóstico precoz del cáncer de próstata en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 30(1):124-8.
 58. Ramos S, Alia M, Bravo L, Goya L. (2005). Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J Agric Food Chem.* 53(4):1271-80.
 59. Rondón, J. (1983). Estudio preliminar de Sterculiaceae en la región nor-oriental del país. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.

60. Salleh W, Ahmad F, Yen K, Sirat H. (2011). Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Piper caninum* Blume. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 7720–7731.
61. Tan LY, Yin WF, Chan KG. (2013). *Piper nigrum*, *Piper betel* and *gnemon* Gnetum - natural food sources with anti-quorum sensing. *Sensors (Basel)*. 20; 13:3975-85.
62. Van-Poppel H., Tombal, B. (2011). Chemoprevention of prostate cancer with nutrients and supplements. *Cancer Management and Research*. 3(1): 91–100.
63. Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, MJ, Spencer, J.P. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*. 2(11):1106-31.
64. Wang, O., Liu, S., Zou, J., Lu, L., Chen, L., Qiu, S., et al. (2011) Anticancer Activity of 2a, 3a, 19b, 23b-Tetrahydroxyurs-12-en-28-oic Acid (THA), a Novel Triterpenoid Isolated from *Sinojackia sarcocarpa*. *PLoS ONE* 6(6): e21130. doi:10.1371/journal.pone.0021130.
65. Webster P, Roberts D, Benson R, Kearns G. (1996). Acetaminophen toxicity in children: Diagnostic confirmation using a specific antigenic biomarker. Lippincott-Raven Publishers.; 36(5):397-402.
66. Weng, C.J., Yen, G.C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev*. 38(1):76-87.
67. Zarai Z, Kadri A, Chobba IB, Mansour RB, Bekir A, Mejdoub H, Néji G. (2011). The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in Health and Disease*.10:161.
68. Zongo, F., Ribuo, C. Boumendjel, A., Guissou, I. (2013). Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L. (syn. *Waltheria americana*): A review, *Journal of Ethnopharmacology*. 148 (1):14-26.

ANEXO 01

Clasificación taxonómica de la especie *Waltheria ovata* Cav. "lucraco"

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N° 05-USM-2014

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Planta completa), recibida de **Oscar HERRERA CALDERON**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Waltheria ovata* Cav.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: DILLENIIDAE

ORDEN: MALVALES

FAMILIA: STERCULIACEAE

GENERO: Waltheria

ESPECIE: *Waltheria ovata* Cav.

Nombre vulgar: "Lucraco".

Determinado por: Blgo. Mario Benavente.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 17 de enero de 2014

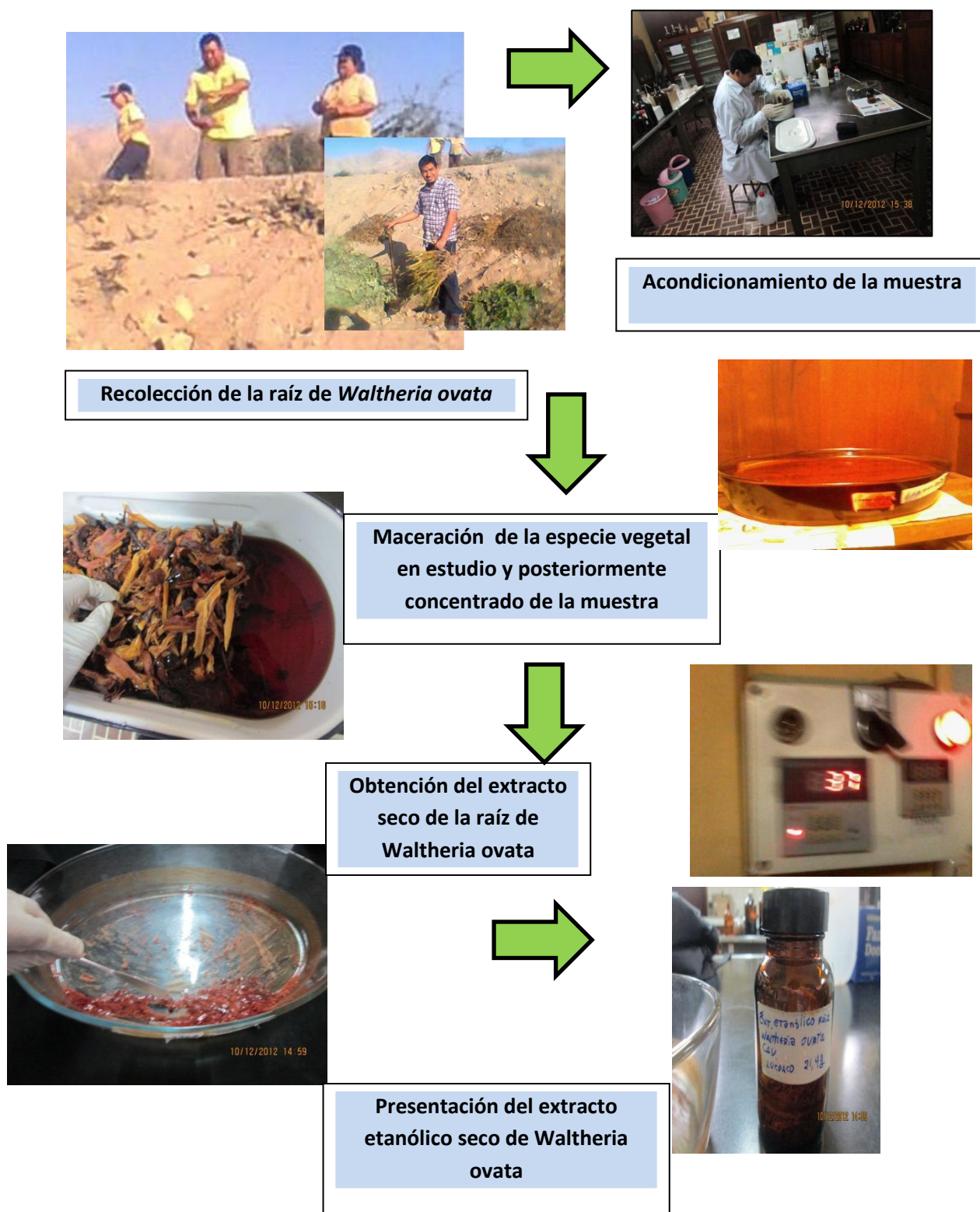


Dr. HAYDEE MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)
JEFE

ANEXO 02

SECUENCIA FOTOGRÁFICA DE LOS ENSAYOS REALIZADOS AL
EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAIZ DE *Waltheria ovata* Cav.

A) Estudio fitoquímico:

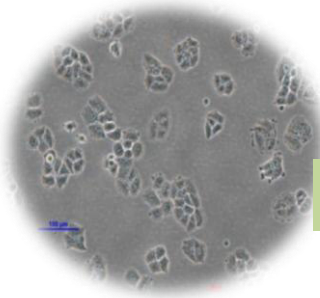


ANEXO 03

Estudio antitumoral sobre la línea celular 3T3 (fibroblastos normales de ratón) y DU-145 (adenocarcinoma de próstata humano):

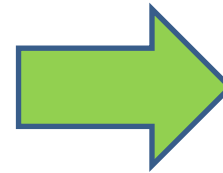


Conteo de células en microscopio



Células de cáncer de próstata (DU-145)

Se desarrollo en medio de cultivo MEM (*Minimum Essential Médium*) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 50 µg/mL de gentamicina



El trabajo se realizó en una cámara de flujo laminar



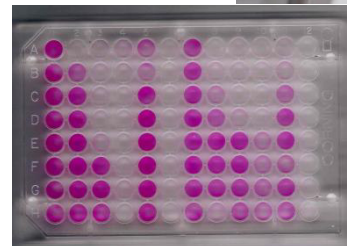
Fibroblastos normales de ratón (3T3)

Creció en Medio DMEM (*Dulbecco modified Eagle médium*)

Se desarrolló en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 50 µg/mL de gentamicina.



Las líneas celulares de cáncer de próstata (DU-145) y fibroblastos normales de ratón (3T3), fueron expuestas a cuatro concentraciones del extracto etanólico de *Waltheria ovata* y 5-fluorouracilo (5-FU) como control positivo



Método de SRB propuesto por Skehan et al.

Se hallaron los porcentajes de crecimiento en 48 horas respectivamente. Se considera activa, si el extracto tiene una $GI_{50} < 20$ µg/mL



ANEXO 04

Actividad antioxidante por el método de FRAP.



**Medir la absorbancia
del FRAP (Abs inicial)**



**Añadir una de las
diluciones de Trolox
o del extracto
etanólico.**



**Medir la absorbancia
después de 6 minutos
(Abs final)**

ANEXO 05

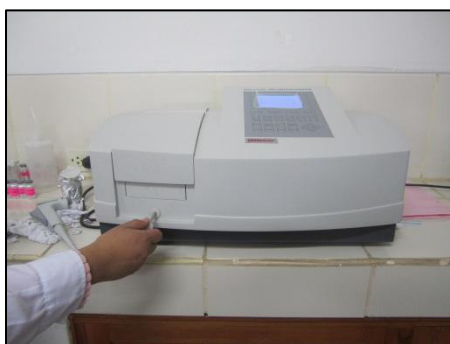
Actividad antioxidante por el método de DPPH.



**Medir la absorbancia
del DPPH (Abs inicial)**



**Añadir una de las
diluciones de Trolox
o del extracto
etanólico.**



**Medir la absorbancia
después de 30 minutos
(Abs final)**

ANEXO 06

Actividad antioxidante por el método de ABTS.



**Medir la absorbancia
del ABTS (Abs inicial)**



**Añadir una de las
diluciones de Trolox
o del extracto
etanólico.**



**Medir la absorbancia
después de 4 minutos
(Abs final)**



ANEXO 07

Evaluación de la seguridad a nivel preclínico en ratas Holtzman.



Extracción de sangre



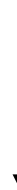
Centrifugar



Extracción del suero



**Mezcla de los reactivos
con el suero**



Lecturas de las muestras

